



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Farmacogenética no tratamento do cancro da mama

Trabalho submetido por

Miguel Maria Moreira da Cunha e Cabrita Matias

para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro

Fevereiro de 2014

Agradecimentos

Em primeiro lugar, nesta etapa final da minha vida académica, tenho que agradecer aos membros da minha família por me terem apoiado sempre nos maus momentos e por estarem presentes nos bons. E pelo seu papel determinante na minha vida ajudando-me a ultrapassar os obstáculos tanto a nível pessoal como académico.

Aos meus amigos mais próximos, pelos momentos de amizade, companheirismo e descompressão com que posso contar sempre, bem como pelas palavras de incentivo e apoio incondicionais que recebo deles. Tenho a consciência de que parte da pessoa que sou hoje se deve a eles. Um obrigado adicional à Sofia, Margarida e Monteiro que me acompanharam muitas noites a trabalhar nesta dissertação.

Aos meus amigos e colegas de curso “iluminados” António, Diogo e Rúben com quem tenho mais afinidade neste instituto, não só por terem estado sempre ao meu lado, prontos para ajudar quando necessário, mas também pelos momentos que passámos juntos que me permitirão guardar boas recordações destes anos da minha vida.

Quero deixar aqui expresso o meu agradecimento à Prof. Doutora Ana Clara Ribeiro pela paciência e disponibilidade que teve ao orientar-me e aconselhar-me durante a elaboração desta monografia.

Resumo

O cancro da mama é uma patologia de alta incidência e mortalidade no sexo feminino tanto em Portugal como no resto do mundo. Esta monografia vai centrar-se no estudo da influência que os polimorfismos genéticos das enzimas metabólicas, dos transportadores de efluxo e dos receptores de estrogénio, têm na resposta à terapia com o tamoxifeno para o cancro da mama. Os estudos que analisaram o papel do genótipo do citocromo P450 2D6 (CYP2D6) na resposta a este fármaco são controversos, a maioria destes defende que indivíduos metabolizadores lentos (PM) e intermédios (IM) revelam piores resultados do que os metabolizadores extensivos (EM), embora apenas num dos estudos com maior impacto se tenha observado a mesma associação. O polimorfismo CYP2C19*2 demonstrou ser benéfico na população Holandesa, já nas populações Japonesa, Alemã e Polaca não influenciou a eficácia terapêutica. Noutro polimorfismo do mesmo gene, o CYP2C19*17, foram observados resultados contraditórios tanto quanto ao seu valor preditivo como prognóstico. No gene CYP3A4, o alelo T para o polimorfismo CYP3A4*22 foi associado a maiores concentrações de tamoxifeno e dos seus metabolitos e o polimorfismo CYP3A4*1B foi associado a maior risco de desenvolvimento de cancro do endométrio. Na análise do gene CYP3A5, apenas um estudo observou uma correlação, sendo esta inesperada, do alelo *3 (que codifica para actividade nula da enzima) com melhores resultados terapêuticos. A mesma situação se revelou para a sulfotransferase 1A1 (SULT1A1), em que o polimorfismo SULT1A1*2 (origina reduzida actividade catalítica da enzima) foi correlacionado com menor tempo livre de doença. Os polimorfismos ao nível dos receptores de estrogénio demonstraram ter um papel importante na modulação da resposta terapêutica com o tamoxifeno ao nível de efeitos secundários e reacções adversas. Adicionalmente, o genótipo ESR1 (gene *estrogen receptor-1*) PvuII T/T em associação com pelo menos um alelo *wt* (tipo selvagem) UGT2B15 demonstraram originar pior resposta ao tratamento. Face às várias limitações apresentadas nos estudos analisados, são necessários estudos com maior amostragem e maior controlo sobre variáveis que possam inviabilizar os estudos por forma a abrir caminho para a medicina personalizada.

Palavras-chave: cancro de mama, farmacogenética, tamoxifeno, terapia hormonal

Abstract

Breast Cancer is a disease of high incidence and mortality in the female sex, both in Portugal and in the rest of the world. This monograph will focus on the study of the influence that genetic polymorphisms of metabolic enzymes, efflux transporters and estrogen receptors, have on response to tamoxifen therapy for breast cancer. The studies that analyzed the role of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotype in response to this drug are controversial, most of these argue that poor metabolizers (PM) and intermediate (IM) have worse results than extensive metabolizers (EM), although in only one of the studies with higher impact the same association was observed. The CYP2C19*2 polymorphism was beneficial to the Dutch population, but in Japanese, German and Polish populations it didn't affect the therapeutic efficacy. In another polymorphism in the same gene, CYP2C19*17, contradictory results were observed regarding its predictive and prognostic value. In the CYP3A4 gene, the T allele for the CYP3A4*22 polymorphism was associated with higher concentration of tamoxifen and its metabolites and CYP3A4*1B polymorphism was associated with increased risk of developing endometrial cancer. In analyzing the CYP3A5 gene, only one study found a correlation, which is unexpected, between *3 allele (encoding null enzyme activity) and better therapeutic results. The same situation was observed for sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) in which SULT1A1*2 (originates reduced catalytic activity of the enzyme) polymorphism has been correlated with shorter disease-free period. The polymorphisms at the estrogen receptors have demonstrated an important role in modulating the response to tamoxifen treatment in terms of secondary effects and adverse reactions. Additionally, the ESR1 (estrogen receptor-1 gene) PvuII T/T genotype in association with at least one UGT2B15 wild type (wt) allele originated poorer response to treatment. Given the various limitations presented in the analyzed studies, larger population and greater control over variables are needed to reach a personalized medicine.

Keywords: breast cancer, pharmacogenetics, tamoxifen, hormonal therapy

Índice

1. Introdução.....	11
2. Cancro da Mama.....	13
2.1. Factores de risco	15
2.2. Detecção e Diagnóstico	17
2.3. Tratamento.....	19
2.3.1. Terapia Endócrina.....	20
2.4. Proteínas responsáveis pela variabilidade de respostas ao tamoxifeno.....	21
3. Tamoxifeno	25
4. Estudo farmacogenético do tratamento com tamoxifeno	29
4.1. CYP2D6.....	29
4.2. CYP2C9.....	37
4.3. CYP2C19	37
4.4. CYP3A4.....	39
4.5. CYP3A5.....	40
4.6. SULT1A1.....	42
4.7. UGT1A8, UGT2B7 e UGT2B15	43
4.8. ABCB1, ABCC2 e ABCG2	44
4.9. ESR1 e ESR2.....	45
5. Conclusão	48
Bibliografia.....	52

Índice de figuras

Figura 1: Imagem representativa da constituição da mama saudável. Retirada de http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-cancer , consultado em 06/02/2014.....	13
Figura 2: Modelo de Higgins do mecanismo de acção da glicoproteína-P retirada de Huber <i>et al.</i> (2010)	23
Figura 3: Imagem representativa da estrutura de ERs. Retirada de D'Abreo and Hindenburg (2013).	24
Figura 4: Mecanismos de acção do estrogénio e tamoxifeno no ER. Retirada de Clemons <i>et al.</i> (2002).	25
Figura 5: Representação do metabolismo do tamoxifeno em humanos. Retirada de K. Kiyotani et al. (2013).....	28

Lista de abreviaturas

4-OH-N-DMT- Endoxifeno

4-OHT: 4-hidroxi-tamoxifeno

α -OHT: α -hidroxi-tamoxifeno

A: Adenina

ABC: Adenosina Trifosfato- *binding cassette*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AF-1: Região de activação funcional transcricional ligando-independente

AF-2: Região de activação funcional transcricional ligando-dependente

AI: Inibidores da aromatase

Ala: Alanina

Arg: Arginina

ASCO: *American Society of Clinical Oncology*

Asp: Ácido Aspártico

ATAC: *Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination*

BCRP: *Breast cancer resistance protein*

BIG: *Breast International Group*

BMD: Densidade mineral óssea

BRCA1: gene *breast cancer 1*

BRCA2: gene *breast cancer 2*

BHGI: *Breast Health Global Initiative*

C: Citosina

CDI: Carcinoma ductal invasivo

CLI: Carcinoma lobular invasivo

CNV: *Copy Number Variation*

CYP: Citocromo P450

Cys: Cisteína

DBD: Domínio de ligação ao ADN

DCIS: Carcinoma ductal *in situ*

EBCTCG: *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*

EM: Metabolizadores extensivos

ER: Receptores de estrogénio

ERE: Elementos de resposta ao estrogénio
ESR1: *Estrogen Receptor-1*
ESR2: *Estrogen Receptor-2*
FDA: *Food and Drug Administration*
G: Guanina
Gly: Glicina
GST: Glutathione S-transferases
HDL: Lipoproteínas de alta densidade
HER2: Receptores-2 de factor de crescimento epidérmico humano
His: Histidina
IHC: Imunohistoquímica
IMC: Índice de massa corporal
IM: Metabolizadores intermédios
ISH: Hibridação *in situ*
LBD: Domínio de ligação de ligandos
LDL: Lipoproteínas de baixa densidade
LCIS: Carcinoma lobular *in situ*
LCR: Líquido cefalorraquidiano
Met: Metionina
MDR: Resistência adquirida a múltiplos fármacos
MDR1: *Multidrug resistance 1*
MRP2: *Multidrug resistance-associated protein 2*
N-DMT: N-desmetil-tamoxifeno
NAT: N-acetil transferases
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
NCCTG: *North Central Cancer Treatment Group*
PM: Metabolizadores lentos
PR: Receptores de progesterona
RNA: Ácido ribonucleico
SERM: Modulador selectivo de receptores de estrogénio
SERD: Degradador selectivo de receptores de estrogénio
SNP: *Single nucleotide polymorphism*
SULT: Sulfotransferase
T: Timina

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

TNM: *Tumor-node-metastases*

UGT: Uridina Difosfato- glucoronil transferase

UM: Metabolizadores ultra rápidos

WE CARE: *Women's Environment Cancer and Radiation Epidemiology*

WHEL: *Women's Healthy Eating and Living*

WHO: *World Health Organization*

wt: Tipo selvagem

1. Introdução

O cancro da mama é uma neoplasia maligna sendo um problema de saúde pública com alta incidência e mortalidade na mulher. Actualmente em Portugal ocorrem 4.500 novos casos de cancro de mama por ano na população feminina (<http://www.ligacontracancro.pt/gca/?id=42#>, consultado em 06/02/2014). De facto, o cancro da mama é a neoplasia mais comum no sexo feminino na maior parte do mundo, contando com 23% de todos os cancros na mulher. O número de casos desta patologia está a aumentar em países subdesenvolvidos face ao aumento da esperança média de vida e adopção do estilo de vida próprio de países desenvolvidos através de novos hábitos alimentares, exposição a hormonas exógenas, entre outros factores (Yip *et al.*, 2008).

A WHO (*World Health Organization*) considera a detecção precoce a principal estratégia de controlo desta patologia por forma a aumentar a taxa de sobrevivência à doença. A melhor maneira de alcançar este objectivo é através de mamografias de rastreio em países de alto rendimento, podendo reduzir a mortalidade em 20% em mulheres de todas as idades, e diagnóstico precoce principalmente em países de baixo e médio rendimento onde as doenças são normalmente diagnosticadas em estados avançados, possibilitando assim iniciar a terapêutica num estado menos avançado da doença (<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index3.html>, consultado em 04/02/2014).

Cerca de 70-75% dos cancros de mama são considerados positivos para receptores de estrogénio (ER) - positivos e metade destes considerados positivos para receptores de progesterona (PR) - positivos (Liu *et al.*, 2010). O tamoxifeno é o fármaco mais utilizado para o tratamento do cancro da mama considerado ER- positivo em todo o mundo (M. J. Higgins & Stearns, 2011; Teft *et al.*, 2013). No entanto 30 a 50% dos pacientes com cancros ER- positivos não respondem à terapêutica com este fármaco (Teh *et al.*, 2012).

Tradicionalmente, apenas factores clínicos e histopatológicos têm sido tidos em conta para a escolha da terapêutica em pacientes com neoplasias. Variações na resposta a fármacos e na sobrevivência em indivíduos com o mesmo esquema terapêutico levaram a um aumento do número de estudos sobre o papel da farmacogenética no tratamento do cancro da mama, bem como de outros cancros. O termo farmacogenética refere-se ao estudo da influência das variações genéticas dos indivíduos sobre a resposta a fármacos, tanto a nível de eficácia como de segurança (Westbrook & Stearns, 2013).

O uso de perfis genómicos para melhor percepção do risco de recorrência de tumores, resistência e toxicidade a fármacos poderia ser muito útil para melhor adaptar a terapêutica em indivíduos com cancro de mama. Possibilitando assim o uso de medicina personalizada, sendo esta adaptada a cada paciente (Rofaiel, Muo, & Mousa, 2010).

A escolha deste tema deve-se à prevalência desta patologia nas mulheres do nosso país e do resto do mundo, aliado à farmacogenética cujos estudos me suscitam curiosidade e interesse. Nesta monografia irei falar da terapia endócrina, mais especificamente do tamoxifeno pelo facto de este fármaco ser o mais utilizado para esta doença e assim contribuir para o seu conhecimento a nível farmacogenético de modo a que o seu uso terapêutico seja o mais correcto.

2. Cancro da Mama

O carcinoma da mama é uma neoplasia maligna localizada no tecido epitelial mamário. Por regra, as células cancerígenas distinguem-se das células de um tumor benigno pelo menor grau de diferenciação, pela maior taxa de crescimento do tumor e pela capacidade de invadir as células circundantes ou mesmo propagar para outros órgãos do organismo (criando metástases). Esta doença surge maioritariamente em mulheres, embora possa também surgir em homens (Cotran, Kumar, & Robbins, 1994).

Nesta patologia, os indivíduos são divididos por estádios consoante a extensão do tumor primário, o estado dos gânglios linfáticos envolventes e a presença ou não de metástases distantes, definidos pelo sistema TNM (*tumor-node-metastases*). Este sistema pode ser utilizado antes da cirurgia ou terapia neoadjuvante (dada antes da cirurgia) avaliando o estadiamento clínico, ou durante a cirurgia avaliando o estadiamento patológico, ou mesmo entre o final da terapia neoadjuvante e a cirurgia (Edge *et al.*, 2010).

Para melhor compreensão das descrições dos diferentes tipos de cancro da mama é possível observar a constituição da mama saudável na figura 1.

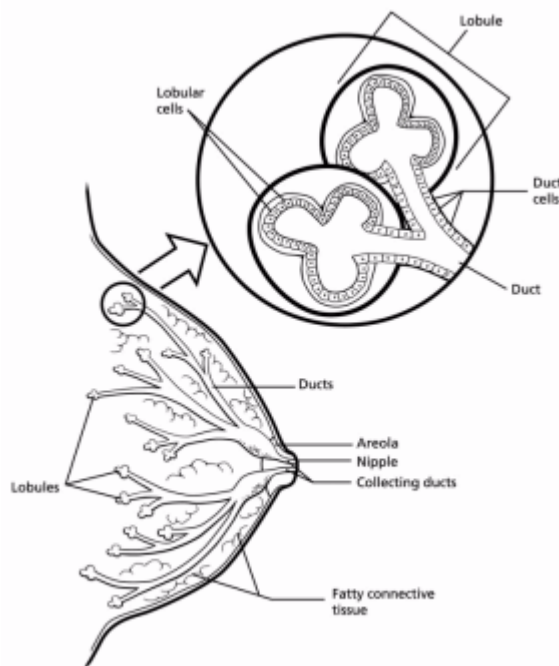


Figura 1: Imagem representativa da constituição da mama saudável. Retirada de <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detail/edgeuide/breast-cancer-what-is-cancer>, consultado em 06/02/2014

O estágio 0 do cancro de mama segundo o sistema TNM inclui os carcinomas não invasivos: carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular *in situ* e doença de *Paget* desde que esta não esteja associada a doença invasiva (Edge *et al.*, 2010).

O carcinoma ductal *in situ* (DCIS) caracteriza-se pela proliferação de células epiteliais no interior de ductos e lóbulos mamários sem aparentes sinais de invasão do estroma circundante, através da membrana basal. Este tipo de cancro é normalmente detectado através de existência de microcalcificações na mamografia, mas também pode manifestar-se através de tumores palpáveis ou como doença de *Paget* do mamilo apresentando ou não massa e libertação patológica de líquido (DeVita, Hellman, & Rosenberg, 1997).

O carcinoma lobular *in situ* (LCIS) é uma proliferação de células no interior de ductos e lóbulos, delimitadas pela membrana basal, e que preenchem, distendem ou deformam pelo menos 50% das unidades acinares de um único lóbulo. O diagnóstico desta proliferação celular é sempre accidental uma vez que não forma massa nem calcificações (Cotran *et al.*, 1994). Apesar de ser chamado LCIS, esta condição não é mesmo um cancro, é um marcador de risco acrescido de desenvolvimento de cancro do tipo invasivo em ambas as mamas (Hammer, Fanning, & Crowe, 2008).

Os estádios I e II incluem cancros invasivos de estágio precoce, o estágio III inclui cancros localmente avançados (maiores que 5cm) e o estágio IV é representado pelos cancros metastáticos (Maughan, Lutterbie, & Ham, 2010).

O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o tipo de carcinoma mais abundante e representa 80% dos carcinomas com capacidade de infiltrar nos tecidos circundantes. Por ser de natureza invasiva, tem a capacidade de metastizar através do sistema linfático ou da corrente sanguínea (<http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/o-cancro-da-mama.html>, consultado em 05/11/2013).

O carcinoma lobular invasivo (CLI) representa 5 a 10% dos carcinomas invasivos e é tendencialmente bilateral e com vários focos de origem. Este tipo de carcinoma metastiza-se com mais frequência para o LCR (líquido cefalorraquidiano), ovário, útero

e medula óssea que os restantes subtipos de cancro de mama. Os tumores podem ser de consistência dura ou difusa, o que dificulta a sua detecção (Cotran *et al.*, 1994).

Existem ainda outros tipos de cancro de mama que são classificados pela sua histopatologia e cujo estudo farmacogenético ultrapassa o objectivo proposto.

2.1 Factores de risco

O cancro de mama é causado por uma combinação de factores genéticos e ambientais, na qual polimorfismos genéticos têm diferentes efeitos no desenvolvimento de cancro consoante a exposição a factores ambientais (Song, Lee, & Kang, 2011). Este facto explica-se por estudos de imigração de mulheres asiáticas que foram para os Estados Unidos da América e cujos resultados obtidos foram o aumento progressivo de incidência desta patologia nas sucessivas gerações, aproximando-se da incidência da mesma patologia em mulheres no país de acolhimento (Song *et al.*, 2011; Yip *et al.*, 2008).

Há mais de um século atrás, surgiu a primeira evidência de que a fisiologia reprodutiva está intimamente ligada com o risco de desenvolvimento de cancro da mama, através da observação de George Beatson de que certos cancros de mama em mulheres pré-menopáusicas regrediram em resposta à ooforectomia (remoção cirúrgica dos ovários). Este fenómeno deve-se à exposição a estrogénios, um factor de risco importante no desenvolvimento do cancro da mama (Folkerd & Dowsett, 2013).

Factores de risco como menarca precoce (aos 11 anos de idade ou antes), menopausa tardia (aos 55 anos ou depois), ter o 1º filho já em idade avançada (30 anos ou mais) e nuliparidade estão associados à exposição a estrogénio endógenos ao longo da vida (Hulka & Stark, 1995).

Numa revisão sistemática realizada em 2013, foi sugerido que tal como as hormonas endógenas, também as hormonas exógenas como a toma de contraceptivos orais e terapia hormonal de substituição aumentam o risco de desenvolvimento de cancro da mama, pelo mesmo processo, em 10% e 23% respectivamente. Pelo contrário, foi

apoiada a ideia de que a amamentação diminui o risco desta patologia em 11%, devido ao facto de existir um processo de diferenciação das células da mama no período de lactação e existir um decréscimo dos níveis hormonais. Na mesma análise foi sugerido que mulheres com Diabetes Mellitus tipo 2 com hiperinsulinémia têm um aumento de risco na ordem dos 14% (Anothaisintawee *et al.*, 2013).

A idade é um factor já com evidência comprovada e do qual dependem vários outros factores de risco sendo a obesidade um deles. Em mulheres pós-menopáusicas o risco de cancro da mama aumenta com a obesidade, sendo um dos mecanismos plausíveis para explicar tal facto os tecidos adiposos serem uma importante fonte de estrogénios nesta fase da vida da mulher. Já em mulheres pré-menopáusicas este factor é associado a uma diminuição do risco deste cancro, embora a razão para este facto não seja clara (Dumitrescu & Cotarla, 2005).

Factores relacionados com o estilo de vida, dos poucos que são modificáveis, de entre os quais o consumo de álcool e o tabaco também foram descritos como factores que aumentam o risco de cancro da mama, pelo contrário o exercício físico na adolescência diminui o risco de desenvolvimento da doença (Hulka & Stark, 1995).

História familiar de cancro da mama é também um factor de risco importante, certos estudos epidemiológicos demonstraram que a hipótese de uma mulher desenvolver esta patologia é 1,7 a 4 vezes maior que a população em geral se tiver um familiar de 1º grau de parentesco com a doença, embora os dados desta estatística não especifiquem se o resultado deste aumento de incidência se deva a influências ambientais, culturais, genéticas ou a combinação destas (Edlich, Winters, & Lin, 2005).

É sugerido que 70% dos cancros de mama em famílias de alto risco de desenvolver a doença se devam a genes de alta penetrância como BRCA1 (*breast cancer 1*) e BRCA2 (*breast cancer 2*), e que apesar desta percentagem alta só se traduz em menos de 10% de todos os cancros de mama, provavelmente devido à baixa frequência dos alelos responsáveis na população em geral (Song *et al.*, 2011).

2.2 Detecção e Diagnóstico

Segundo a BHGI (*Breast Health Global Initiative*), o diagnóstico e a detecção do cancro da mama devem ser adaptados aos recursos de cada país, pelo que serão diferentes em países de alto rendimento e em países de baixo e médio rendimento. Em países subdesenvolvidos onde os recursos são escassos, na impossibilidade de fazerem mamografias de rastreio, torna-se crucial o exame clínico da mama, uma técnica minuciosa de palpação feita por parte de profissionais de saúde e o auto-exame da mama ensinado pelos mesmos. Deve ser dada a conhecer a importância da detecção precoce do cancro da mama, dando ênfase à maior probabilidade de sobrevivência quando se detecta atempadamente irregularidades como um caroço, alterações na pele (vermelhidão, espessamentos, escoriações) e anomalias do mamilo (Yip *et al.*, 2008).

Nos países desenvolvidos, para a detecção precoce do cancro da mama, as recomendações gerais da *American Cancer Society* são:

- Mulheres com 20 e 30 anos devem sujeitar-se a um exame clínico da mama feito por um profissional de saúde, pelo menos de 3 em 3 anos.
- Mulheres com 40 anos ou mais devem sujeitar-se a um exame clínico da mama feito por um profissional de saúde e mamografia de rastreio anualmente.
- Mulheres com alto risco devem fazer mamografia e ressonância magnética anualmente (começando normalmente aos 30 anos).
- Mulheres com risco moderado devem falar com o seu médico de maneira a debater os riscos e benefícios de fazer ressonância magnética anualmente.

É opção, adicionalmente, as mulheres a partir dos 20 anos realizarem o auto-exame da mama podendo fazê-lo de maneira sistemática ou mais esporádica. No entanto ao fazê-lo regularmente vão ter maior facilidade em detectar qualquer alteração nas mamas. Caso ocorra uma alteração deve-se reportar imediatamente a um profissional de saúde (<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-detection>, consultado em 20/01/2014).

A mamografia é uma modalidade de imagiologia que usa raios-x de baixa energia, para examinar o tecido mamário. Para melhor visualização, o exame é feito de maneira a que as mamas sejam comprimidas e efectua-se em cada uma delas separadamente. Este exame é utilizado como rastreio para detecção em mulheres assintomáticas, como diagnóstico em mulheres sintomáticas, como complemento na biopsia ao localizar a lesão e como vigilância para ter conhecimento em caso de recorrência (http://www.who.int/diagnostic_imaging/imaging_modalities/dim_mammography/en/ consultado em 27/01/2014).

Normalmente, a ecografia mamária é efectuada para complementar a informação obtida por uma mamografia feita primeiramente. De facto, a ecografia ajuda por meio de ultrasons a definir se os nódulos observados são quistos com líquido no seu interior ou são massas sólidas que podem ou não ser cancro (<http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/diagnostico-mama.html>, consultado em 20/10/2013). Este exame é também de primeira linha em mulheres jovens por possibilitar a observação imagiológica em mamas densas (Cardoso, Orvalho, & Oliveira, 2009).

Embora a ressonância magnética tenha maior sensibilidade que a mamografia, não deve substituí-la pois apesar de ser mais provável detectar um cancro com a ressonância magnética, existe certos tipos de cancro que esta pode não detectar que na mamografia seriam observáveis (<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-detection>, consultado em 20/01/2014). Este tipo de exame imagiológico é utilizado nos doentes de alto risco, quando existe adenopatia axilar metastática mas não foi possível localizar o tumor em mamografia e ecografia, e na doença de *Paget* quando o tumor não é identificado na mamografia (Cardoso et al., 2009).

Mulheres com suspeita de cancro de mama são frequentemente referenciadas a biopsia para determinar a natureza do tecido suspeito. Este procedimento pode ser biopsia em cirurgia aberta ou biopsia com agulha. Tendo em conta que este último se baseia em retirar amostras pequenas do tecido suspeito através de uma agulha inserida na pele, é necessário localizar com precisão o local de onde retirar as amostras e para isso recorre-se à palpação ou à imagiologia através de mamografia estereotáxica, ecografia ou ressonância magnética (Bruening et al., 2009).

Caso sejam detectadas células cancerígenas nas amostras retiradas na biopsia, para um conhecimento mais completo do cancro detectado, podem ser pedidos testes específicos para determinação de *status* de biomarcadores como receptores de estrogénio, receptores de progesterona e receptores-2 de factor de crescimento epidérmico humano (HER2) nas referidas amostras. O *status* dos receptores hormonais é analisado normalmente através de testes de imunohistoquímica (IHC), o resultado quanto aos ER do cancro de mama deve ser interpretado, segundo a NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e ASCO (*American Society of Clinical Oncology*), como positivo quando pelo menos 1% das células são consideradas ER- positivas. O *status* HER2 deve ser determinado por técnicas de hibridação *in situ* (ISH) ou IHC (Carlson, Edge, & Theriault, 2013).

2.3 Tratamento

A heterogeneidade de cancros de mama existentes representa um desafio para a escolha do tratamento mais adequado para a doença. Os pacientes beneficiariam bastante da medicina individualizada ou regimes terapêuticos individuais delineados especificamente para tratar os seus tipos de cancro de características particulares (Yang, Nowsheen, Aziz, & Georgakilas, 2013).

Existem cinco tipos principais de tratamentos para a doença, sendo estes: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e terapia biológica. Muitas vezes estas terapias são associadas, constituindo combinações terapêuticas (Yang *et al.*, 2013). A abordagem terapêutica e definição do prognóstico do paciente com cancro de mama têm em conta o sistema de estadiamento TNM. Outros factores importantes são o grau histológico, *status* de receptores hormonais, *status* de expressão de HER2, propagação linfo-vascular, comorbidades, idade e estado menopáusico (Maughan *et al.*, 2010).

Como já foi referido anteriormente, esta monografia centra-se na terapia hormonal, mais concretamente no tamoxifeno, razão pela qual irei analisar especificamente esta terapia.

2.3.1 Terapia Endócrina

A estratégia deste tipo de terapêutica sofreu alterações drásticas desde as cirurgias para remoção dos ovários (impedindo a produção de estrogénios) e remoção das glândulas supra-renais (impedindo a formação de androgénios, evitando assim a conversão destes em estrogénios) até às terapêuticas endócrinas de hoje, baseadas principalmente em suprimir a actividade de enzimas envolvidas na produção de estrogénio ou em bloquear a acção desta ao nível dos receptores (Nicholson & Johnston, 2005).

Embora antigamente fosse sugerido que indivíduos com tumores considerados negativos para ER pudessem adquirir benefício clínico da terapia com tamoxifeno ou outras terapias endócrinas, actualmente existe um elevado grau de evidência que suporta o facto de apenas os indivíduos com tumores considerados positivos para ER demonstrem resposta a estes fármacos (Schiavon & Smith, 2013).

Para escolher o fármaco mais apropriado entre a terapia endócrina, é necessário ter em conta o estado menopáusico da mulher a receber o tratamento, uma vez que o local de produção de estrogénio varia consoante este factor. Nas mulheres pré-menopáusicas a hormona provém maioritariamente dos ovários, enquanto nas mulheres pós-menopáusicas esta é produzida ao nível de diversos tecidos como tecido adiposo, fígado, musculo e tumor mamário através da aromatização de androgénios produzidos pelas glândulas supra-renais (Boughey, Buzdar, & Hunt, 2008).

Este tipo de terapia possui várias classes de fármacos, estando neste incluídos os moduladores selectivos de receptores de estrogénio (SERMs), inibidores da aromatase (AIs) e os degradadores selectivos de receptores de estrogénio (SERDs) (Howell, 2006).

Os SERMs bloqueiam a acção de estrogénios nos seus receptores em cancros de mama, embora também tenham acção agonista nos mesmos receptores em outros tecidos. O tamoxifeno foi o primeiro fármaco desta classe a ser desenvolvido, há mais de 20 anos, continuando a ser utilizado hoje em dia no tratamento desta doença. Com as resistências adquiridas surgiu a necessidade de desenvolver fármacos alternativos pelo que surgiram o toremifeno e idoxifeno, e mais tarde o raloxifeno e arzoxifeno. Embora estes dois

últimos tenham tido resultados em estudos pré-clínicos que sugerissem menor actividade agonista noutros tecidos em relação ao tamoxifeno, o mesmo não se veio a verificar em ensaios de fase II destes fármacos (até porque o raloxifeno é hoje em dia utilizado na prevenção da osteoporose). Esta nova geração de SERMs não provou ser mais eficaz que o tamoxifeno em cancros de mama avançados e demonstraram ter resistências cruzadas com o tamoxifeno (Nicholson & Johnston, 2005).

Os AIs são opções terapêuticas para mulheres pós-menopáusicas. Estes fármacos têm estrutura semelhante à dos substratos e competem com estes na ligação à enzima aromatase, responsável pela conversão de androgénios em estrogénios ao nível dos tecidos periféricos. Provocando, nestas mulheres, a diminuição dos níveis da hormona para valores quase indetectáveis. Estes fármacos estão separados em dois grupos: os de tipo I incluem o exemestano e formestano, estes são esteróides e inibem a enzima irreversivelmente; os de tipo II incluem o anastrozol e letrozol, não são esteróides e inibem a enzima reversivelmente (Boughey *et al.*, 2008).

Os SERDs são fármacos puros antagonistas, não tendo concomitantemente efeito agonista ao contrário dos SERMs. O fulvestrant é o representante desta classe, tendo sido aprovado em 2002 para o tratamento do cancro de mama em mulheres pós-menopáusicas com cancro de mama metastático ou doença progressiva depois de terapia anti-hormonal (Sainsbury, 2013). Este fármaco é estruturalmente distinto dos SERMs e apresenta afinidade para os ER superior à do tamoxifeno. Para além da acção antagonista, o fulvestrant reduz os níveis celulares dos receptores de estrogénio e progesterona (Howell, 2006).

2.4 Proteínas responsáveis pela variabilidade de respostas ao tamoxifeno

Diferenças na farmacodinâmica e farmacocinética dos fármacos contribuem para a variabilidade de resultados terapêuticos e severidade de reacções adversas entre pacientes, como tal, os polimorfismos genéticos nos genes que codificam transportadores de fármacos, enzimas metabólicas de fase I e II, alvos terapêuticos e

outros genes que interfiram com a resposta terapêutica são os responsáveis por estas variações (Deenen, Cats, Beijnen, & Schellens, 2011).

As enzimas de metabolização de fase I estão envolvidas em reacções de oxidação, redução e hidrólise activando ou inactivando fármacos, tornando-os também mais polares facilitando a sua eliminação (Deenen *et al.*, 2011). As principais enzimas desta fase são uma superfamília de enzimas heme, os citocromos P450 (CYPs), que actuam como monooxigenases, dioxigenases e hidrólases (Jancova, Anzenbacher, & Anzenbacherova, 2010). O CYP2D6 é a enzima mais activa na metabolização do tamoxifeno, assumindo o papel central deste processo. Como tal os seus polimorfismos são a principal causa de variação da biotransformação sendo consequentemente o CYP que mais influencia a eficácia e efeitos adversos deste fármaco (Teft *et al.*, 2013; Teh *et al.*, 2012).

As enzimas metabólicas de fase II transformam as substâncias endógenas e exógenas em formas mais facilmente excretadas e inactivam substâncias farmacologicamente activas através de reacções de conjugação. As enzimas desta fase são maioritariamente transferases e incluem UDP-glucoronil transferases (UGTs), sulfotransferases (SULTs), N-acetil transferases (NATs), glutathione S-transferases (GSTs) e várias metiltransferases (Jancova *et al.*, 2010). No caso do tamoxifeno, as enzimas metabólicas de fase II envolvidas são as SULTs e UGTs (K. Kiyotani, Mushiroda, Nakamura, & Zembutsu, 2012).

Os transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) são uma família de proteínas transmembranares que transportam activamente várias substâncias através de membranas celulares recorrendo a energia sob a forma de adenosina trifosfatada (ATP) e estão subdivididos em sete subfamílias (ABCA a ABCG) segundo a sua semelhança estrutural (Deenen *et al.*, 2011). Estes transportadores, também denominados transportadores de efluxo, são também a principal causa de resistência adquirida a múltiplos fármacos (MDR) observada em células tumorais. A amplificação génica e/ou aumento da expressão destas proteínas originam baixas concentrações celulares dos fármacos dando origem às resistências. O modelo do mecanismo de acção da glicoproteína-P, também denominada ABCB1 ou MDR1 (*multidrug resistance 1*), assim

como para a maioria dos transportadores ABC (com algumas variações) encontra-se representado na figura 2 (Huber, Maruiama, & Almeida, 2010).

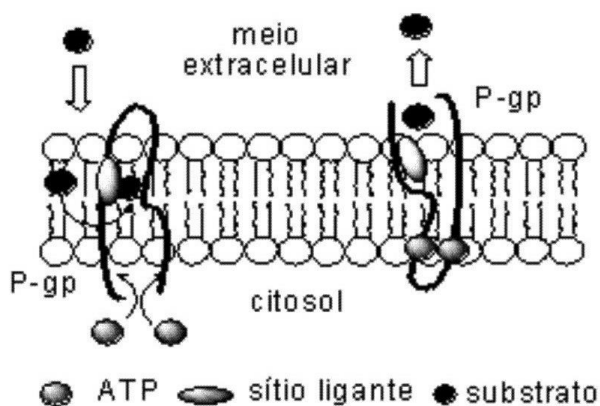


Figura 2: Modelo de Higgins do mecanismo de acção da glicoproteína-P retirada de Huber *et al.* (2010)

Há suspeitas de que os transportadores ABCB1, ABCC2 e ABCG2, também conhecidos como MDR1, MRP2 (*multidrug resistance-associated protein 2*) e BCRP (*breast cancer resistance protein*) respectivamente, transportam produtos resultantes da reacção de conjugação com o ácido glucoronico e de sulfatação, pelo que, podem estar envolvidos no transporte do tamoxifeno e dos seus metabolitos, nomeadamente na excreção biliar destes (Kazuma Kiyotani *et al.*, 2010).

Tanto os receptores ER α como os ER β , alvos terapêuticos do tamoxifeno, fazem parte da superfamília de receptores nucleares de hormonas esteróides, sendo estes constituídos por cinco domínios (figura 3). O domínio A/B ou terminal-N possui a região de activação funcional transcricional ligando-independente (AF-1), o domínio C ou domínio de ligação ao ADN (DBD) é constituído por dois dedos de zinco, domínio D que contem um sinal de localização nuclear, domínio E ou domínio de ligação de ligandos (LBD) que possui a região de activação funcional transcricional ligando-dependente (AF-2) e o domínio F ou terminal-C cuja função ainda não foi esclarecida (D'Abreo & Hindenburg, 2013).



Figura 3: Imagem representativa da estrutura de ERs. Retirada de D'Abreo and Hindenburg (2013).

Na via clássica de transdução do sinal do estrogénio, uma série de eventos é desencadeada pela ligação estrogénio-receptor o que leva a uma transcrição de genes envolvidos na replicação celular (Nicholson & Johnston, 2005). Esta via, mais estudada pela comunidade científica do que as alternativas inicia-se com a ligação da hormona à região LBD do receptor. Isto permite a ligação do ER através da sua região DBD a sequências de ADN chamadas elementos de resposta ao estrogénio (ERE) (Yang *et al.*, 2013). As duas regiões de activação funcional transcricionais AF-1 e AF-2 interagem com co-activadores transcricionais, iniciando assim a transcrição ao estimular a actividade da RNA polimerase II (Clemons, Danson, & Howell, 2002).

Entretanto, foram descobertos caminhos alternativos para esta via de transdução do sinal, independente da hormona como a fosforilação dos receptores por acção de factores de crescimento ou outros activadores de proteínas kinases (Nicholson & Johnston, 2005).

A expressão dos receptores de progesterona está altamente correlacionada com a expressão dos receptores de estrogénio mas o efeito do *status* de PR na terapêutica parece ter menos importância do que o *status* de ER (Del Re, Michelucci, Simi, & Danesi, 2012) De facto, o valor adicional do *status* de PR tem permanecido controverso (Liu *et al.*, 2010).

3. Tamoxifeno

O tamoxifeno é um modulador selectivo de receptores de estrogénio (SERM) utilizado em cancros de mama hormono-dependentes devido à sua acção antagonista nos receptores de estrogénio por inibição competitiva, impedindo a acção proliferativa da hormona nas células do tumor (Brooks *et al.*, 2013; Tucker *et al.*, 2005).

A actividade anti-estrogénica deste fármaco deve-se à estrutura da substância que ao contrário da estrutura dos estrogénios, possui uma cadeia lateral que forma uma protuberância, estendendo-se esta para além da superfície da região LBD quando formado o complexo ER-tamoxifeno. Esta alteração estrutural vai deslocar a hélice 12, sendo que esta passa a ocluir a superfície de ligação de co-activadores. Como resultado, o tamoxifeno permite a ligação do receptor ao ADN mas impede a ligação de co-activadores à região AF-2 (Webb *et al.*, 2000). Com AF-2 inactiva e apenas AF-1 activa, há uma atenuação da transcrição bloqueando o ciclo celular na fase G₁ (figura 4), o que diminui a proliferação celular (Clemons *et al.*, 2002).

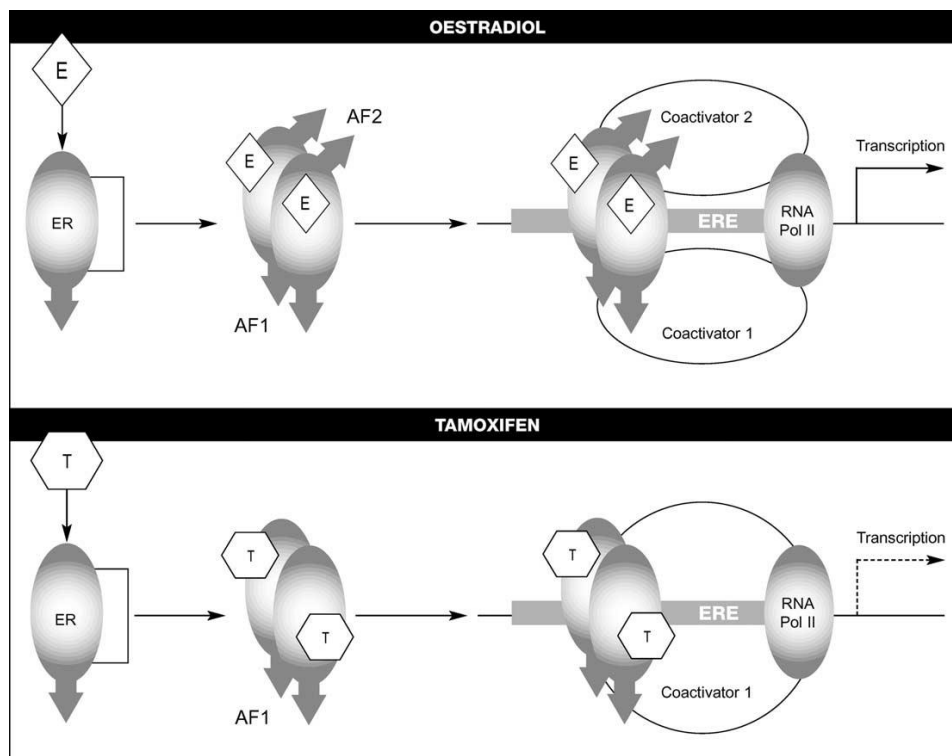


Figura 4: Mecanismos de acção do estrogénio e tamoxifeno no ER. Retirada de Clemons *et al.* (2002).

O tamoxifeno é considerado um SERM devido ao facto de actuar tanto como antagonista como agonista do estrogénio, dependendo da sua localização no organismo (Wood & Osborne, 1998; Yang et al., 2013). Nas células de cancro de mama, onde a actividade da região AF-2 é o mecanismo dominante para a função do ER, o fármaco comporta-se como antagonista, já no útero, é a região AF-1 a dominante pelo que actua como agonista (Abdulkareem & Zurmi, 2012; D'Abreo & Hindenburg, 2013).

Assim, o tamoxifeno para além de exercer efeitos anti estrogénicos em tecidos como o tumor da mama, desempenha também um efeito agonista em certos tecidos. O efeito estrogénico no fígado origina a redução dos níveis séricos de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), já os efeitos relatados em lipoproteínas de alta densidade (HDL) e triglicéridos não são tão consistentes (Ntukidem *et al.*, 2008). No osso preserva ou aumenta a densidade mineral óssea (BMD) nomeadamente da coluna vertebral ao nível lombar em mulheres pós-menopáusicas (Yoneda *et al.*, 2002). No endométrio provoca o aumento do risco de complicações como hiperplasia, pólipos, fibrose uterina, endometriose e carcinoma do endométrio. Outros efeitos secundários deste fármaco são afrontamentos, alterações oculares, eventos tromboembólicos e hepatotoxicidade (Munshi & Singh, 2008).

É administrado por via oral na dose usual de 20 mg por dia, sendo que doses superiores a esta não se revelaram mais eficazes. A maior parte do fármaco é metabolizado no fígado, o tempo de semi-vida e dos seus metabolitos varia entre 7-14 dias e é excretado maioritariamente pelas fezes (Wood & Osborne, 1998).

Foi primeiramente aprovado em 1977 pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do cancro da mama metastático, mais tarde foi também aprovado pela mesma entidade como tratamento adjuvante em cancro de mama precoce e na prevenção da patologia em mulheres de alto risco (Brauch & Schwab, 2013; Lazarus & Sun, 2010). Um estudo do EBCTCG (*Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group*) demonstrou que com o uso de tamoxifeno durante 5 anos, o risco de recorrência de cancro da mama decresce quase para metade durante os 10 anos seguintes e a mortalidade anual associada à doença diminui cerca de um terço durante os 15 anos seguintes (Palmieri, Patten, Januszewski, Zucchini, & Howell, 2013; Saladores, Precht, Schroth, Brauch, & Schwab, 2013).

O tamoxifeno é um pró-fármaco, como tal a própria molécula tem pouca afinidade para os receptores de estrogénio, depois de biotransformação por metabolização através de enzimas de fase I e II converte-se em metabolitos activos e inactivos (Michaela J Higgins & Stearns, 2010). A variabilidade dos genes que codificam as enzimas do Citocromo P450 envolvidas no metabolismo do tamoxifeno é uma possível causa para a diferença das concentrações plasmáticas do fármaco e dos seus metabolitos activos entre indivíduos e consequentemente para a eficácia do tratamento (Brooks *et al.*, 2013; Ruiter *et al.*, 2010).

O 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT) e N-desmetil-tamoxifeno (N-DMT) são os metabolitos primários principais deste fármaco sendo a formação destes catalisada por diversos CYPs (figura 5). O primeiro, considerado metabolito activo por ter 100 vezes mais afinidade para os ER e 30 a 100 vezes mais potência que o tamoxifeno, é formado pela acção das enzimas CYP2D6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4. Para o segundo são as enzimas CYP3A4 e CYP3A5 as principais envolvidas no processo, com menor contribuição das CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9 e CYP2C19 (K. Kiyotani, Mushiroda, Nakamura, *et al.*, 2012). Outro metabolito primário é o α -hidroxi-tamoxifeno (α -OHT), uma substância capaz de reagir com o ADN formando aductos o que lhe confere capacidade genotóxica. Este carcinogénio é formado pela biotransformação do tamoxifeno maioritariamente através da enzima CYP3A4 (Chu *et al.*, 2007).

Inicialmente os resultados da terapêutica com o tamoxifeno eram associados às concentrações do metabolito primário activo 4-OHT, mais tarde foi descoberto outro metabolito activo (K. Kiyotani, Mushiroda, Nakamura, *et al.*, 2012). Novos dados revelam que 4-hidroxi-N-desmetil-tamoxifeno (4-OH-N-DMT), também conhecido como endoxifeno, tem tanta potência e afinidade para os ER quanto o 4-OHT mas apresenta concentrações plasmáticas 6 a 12 vezes superiores às do metabolito primário o que sugere que seja mais importante clinicamente (Michaela J Higgins & Stearns, 2010).

O endoxifeno é o principal metabolito activo podendo ser formado tanto através da biotransformação do N-DMT como do 4-OHT (Hertz, McLeod, & Irvin, 2012). A via de formação predominante deste metabolito secundário é através da metabolização do

N-DMT, o metabolito mais abundante, por intermédio da acção da enzima CYP2D6 (M. P. Goetz *et al.*, 2005; K. Kiyotani, Mushiroda, Zembutsu, & Nakamura, 2013). A outra via de formação do endoxifeno é pela metabolização do 4-OHT, por meio das enzimas CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19 e CYP2D6. Foram descritos ainda outros metabolitos, embora nenhum deles seja tão activo quanto os acima descritos (K. Kiyotani *et al.*, 2013; Saladores *et al.*, 2013).

Tanto o tamoxifeno como os seus metabolitos são posteriormente metabolizados por enzimas de fase II. As SULT, nomeadamente as SULT1A1, são responsáveis por sulfatações dos metabolitos activos 4-OHT e endoxifeno, e as UGT1A4, UGT1A8, UGT1A10, UGT2B7 e UGT2B15 estão envolvidas na glucoronidação do tamoxifeno, 4-OHT e endoxifeno (K. Kiyotani *et al.*, 2013). A glucoronidação é muito importante na eliminação do tamoxifeno e dos seus metabolitos, já que a conjugação destes com ácido glucorónico durante o processo facilita a sua excreção pela bÍlis que é a principal via de excreção do fármaco (Lazarus & Sun, 2010; Sun *et al.*, 2007).

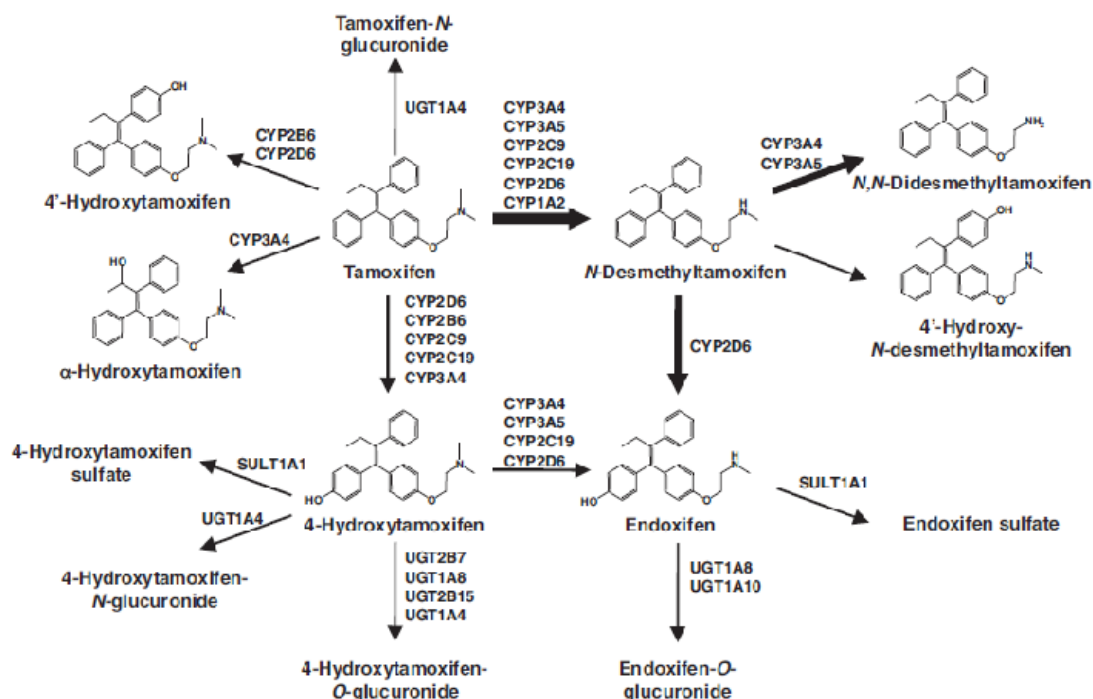


Figura 5: Representação do metabolismo do tamoxifeno em humanos. Retirada de K. Kiyotani et al. (2013).

4. Estudo farmacogenético do tratamento com tamoxifeno

Neste capítulo fez-se a análise das variações genéticas que interferem com a farmacocinética e farmacodinâmica do tamoxifeno.

4.1 CYP2D6

O gene CYP2D6 localiza-se no braço longo do cromossoma 22 e possui uma vasta quantidade de alelos cuja frequência varia consoante a raça/etnia dos indivíduos (Singh, Francis, & Michael, 2011). Nos Caucasianos Europeus, o grupo de alelos funcionais tem uma frequência de 71% que se devem aos alelos CYP2D6*1 e *2, já os alelos não funcionais representam 26% devido maioritariamente ao alelo CYP2D6*4, que apresenta uma frequência média de 20% entre populações Caucasianas. Outros alelos existentes nestas populações são os alelos não funcionais: CYP2D6*3, *5 e *6 e os alelos de actividade reduzida: CYP2D6 *10 e *41. Nos Asiáticos, os alelos com actividade reduzida da enzima têm elevada frequência tendo como principal representante o alelo CYP2D6*10. A frequência de alelos funcionais nas populações Africanas e Afro-Americanas são, à semelhança da Asiática, de cerca de 50%. Nestas populações existe maior variedade de alelos associados a actividade nula ou reduzida da enzima, destes, o polimorfismo CYP2D6*17 é o principal alelo sendo responsável pela diminuição da capacidade metabólica da enzima cerca de 50% (Bradford, 2002).

O CYP2D6 possui vários SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*) o que leva a classificar os indivíduos em vários fenótipos: UM (metabolizadores ultra rápidos), EM (metabolizadores extensivos), IM (metabolizadores intermédios) e PM (metabolizadores lentos) tendo já sido documentadas relações directas com os níveis plasmáticos de endoxifeno (Teft *et al.*, 2013). Nesta revisão bibliográfica, normalmente o fenótipo é associado aos seguintes genótipos: 1) PM são homozigóticos e heterozigóticos compostos para CYP2D6*3, *4, *5 ou *6; 2) IM são homozigóticos para CYP2D6*10 ou *41, heterozigótico com alelos IM/PM ou IM/EM ou PM/EM; 3) EM são genótipos com ausência de alelos PM ou IM (Regan *et al.*, 2012; Schroth *et al.*, 2009).

O polimorfismo CYP2D6*4 é caracterizado por uma substituição de G por A no nucleótido 1934 do respectivo gene levando à formação de proteína truncada sem função. Um estudo foi efectuado em 226 pacientes de nacionalidade Sueca em 2005 tendo sido separados em 4 grupos de tratamento: 1) pacientes a quimioterapia, 2) quimioterapia e tamoxifeno, 3) radioterapia, 4) radioterapia e tamoxifeno. Pacientes com pelo menos um alelo CYP2D6*4 tiveram menor risco de recorrência quando a tomar tamoxifeno (como terapia adjuvante na dose de 40 mg/dia) quando comparados com os que não tomaram tamoxifeno. Nos pacientes homozigóticos para o alelo CYP2D6*1 o resultado foi aproximadamente o mesmo entre os que tomaram tamoxifeno e os que não o tomaram. Com um *follow-up* médio de 10.7 anos, os dados obtidos sugerem que os indivíduos portadores do alelo CYP2D6*4 tiveram melhor benefício da terapêutica com tamoxifeno do que pacientes homozigóticos para CYP2D6*1, resultados que não correspondem ao esperado. Os autores referem ainda a necessidade de estudos com maior amostra (Pia Wegman *et al.*, 2005).

No mesmo ano, num estudo de S. A. Nowell *et al.* (2005) em pacientes Caucasianos e Afro-Americanos com cancro de mama a receber tamoxifeno, não se observou associação entre o genótipo CYP2D6*4 e o parâmetro: tempo livre de doença, tendo em conta factores como idade, estágio da doença, etnicidade e *status* de receptores hormonais. Os mesmos resultados foram observados em pacientes cuja terapêutica não incluiu tamoxifeno. Os autores indicaram limitações como população reduzida em estudo, o polimorfismo em estudo ter baixa frequência na amostra estudada, ausência de informações acerca de medicação tomada pelos participantes e o facto de existir outro alelo CYP2D6 na população Afro-Americana que pode ter influenciado os resultados.

Schroth *et al.* (2007) estudaram vários polimorfismos deste gene em simultâneo na população Alemã, tendo chegado à conclusão que doentes a tomar tamoxifeno como monoterapia adjuvante portadores de alelos nulos: CYP2D6*4 ou *5 e alelos de actividade diminuída: CYP2D6*10 (ou rs1065852; C100T) ou *41 (G2988A), tiveram significativamente menor tempo livre de doença quando comparados com doentes com alelos funcionais.

Nos Estados Unidos da América, em 2005, foi observada associação significativa entre genótipo CYP2D6*4/*4 e piores resultados da terapêutica adjuvante com tamoxifeno em mulheres pós-menopáusicas, recrutadas de um ensaio do NCCTG (*North Central Cancer Treatment Group*), quando comparados com mulheres de genótipos homozigóticos *wt* ou *wt*/*4. Adicionalmente, nenhuma mulher com genótipo homozigótico para o polimorfismo CYP2D6*4 sofreu de afrontamentos moderados ou severos enquanto 20% das mulheres com genótipo *wt*/*4 ou *wt*/*wt* experienciaram este efeito adverso com maior grau de severidade. Uma limitação referida no estudo foi o facto de não haver registos de toma concomitante de inibidores do CYP2D6 (M. P. Goetz *et al.*, 2005).

Dois anos mais tarde, noutro estudo de Matthew P Goetz *et al.* (2007) foi também observada associação entre o polimorfismo CYP2D6*4 e piores resultados provenientes de terapêutica com tamoxifeno em mulheres com cancro da mama. As mulheres com fenótipo EM foram definidas pela ausência de alelos *4 e que não tomaram inibidores CYP2D6, as pacientes com metabolismo CYP2D6 diminuído foram consideradas IM ou PM de acordo com a presença de um ou dois alelos CYP2D6*4 ou a concomitante toma de um inibidor do CYP2D6 moderado ou potente. As PM tiveram menor tempo livre de doença do que as EM e IM.

Com o intuito de explorar as relações entre o genótipo CYP2D6, concentrações de metabolitos do tamoxifeno e resultados terapêuticos foi realizado um estudo em 1370 mulheres com cancro de mama ER- positivos a participar no estudo WHEL (*Women's Healthy Eating and Living*). A análise dos resultados não identificou evidências que suportem uma associação linear entre as concentrações de tamoxifeno ou dos seus metabolitos com resultados terapêuticos. Foi sugerido que existe um limite mínimo de concentração de endoxifeno, a partir do qual se alcança o efeito protector com o qual se tem uma taxa de recorrência 26% menor. Apenas 46% da variação das concentrações de endoxifeno é explicada por variantes conhecidas como: idade, índice de massa corporal (IMC), genótipo CYP2D6 e concentrações de tamoxifeno, o que indica que existem ainda outros factores a contribuir para esta variabilidade das concentrações de metabolitos. Estes resultados podem explicar a variação de resultados de estudos existente quanto à relação entre o genótipo CYP2D6 e efeitos terapêuticos. Apesar de

tudo, os autores admitem a existência de várias limitações pelo que os resultados necessitam de ser confirmados (Madlensky *et al.*, 2011).

Num estudo efectuado em Espanha que relacionou o genótipo do CYP2D6 com as concentrações sanguíneas dos principais metabolitos do tamoxifeno em mulheres ER-positivas que tomaram o fármaco durante 4 meses durante o tempo em que o estudo decorreu. Foi concluído que as PM, representados apenas pelas mulheres homozigóticas para o polimorfismo *4, tiveram concentrações de endoxifeno e 4-OHT 25% inferiores aos EM. Os alelos mais frequentemente encontrados foram *1, *2 e *4 com 35.0%, 21.0% e 18.9% respectivamente, dados concordantes com outros estudos em populações Caucasianas. Face aos resultados, os autores consideraram que muito provavelmente 5.6% das mulheres envolvidas no estudo, sendo ER-positivas e PM, acabariam por tomar tamoxifeno para esta patologia não sendo este o tratamento mais indicado (Zafra-Ceres *et al.*, 2013).

Na mesma população, um resultado semelhante foi observado em que mulheres com o genótipo homozigótico *wt* (tipo selvagem) apresentavam níveis médios de endoxifeno significativamente superiores aos de mulheres com genótipo variante/variante, mas similares aos de mulheres com genótipo *wt*/variante. Foram também estimados rácios produto/substrato, o que possibilitou detectar diferenças significativas entre genótipos CYP2D6 nos rácios de concentrações plasmáticas de endoxifeno/N-DMT mas não nos rácios de 4-OHT/tamoxifeno. Apesar dos resultados obtidos, os autores admitem a necessidade de estudos com impacto para definir a importância de baixas concentrações de endoxifeno nos resultados terapêuticos (Fernandez-Santander *et al.*, 2013).

Também em estudos *in vitro* se constatou que as concentrações de endoxifeno que mimetizam as encontradas no plasma de EM quanto à enzima CYP2D6, mesmo em presença de tamoxifeno e dos metabolitos primários (4-OHT e N-DMT), têm efeitos superiores às encontradas nos PM. (Wu *et al.*, 2009).

Na população Asiática chegou-se à conclusão que os polimorfismos CYP2D6*5 (CYP2D6del) e *10 estão associados com baixas concentrações de endoxifeno e altas concentrações de N-DMT. Já quanto aos níveis de tamoxifeno e 4-OHT não foram detectadas alterações significativas. Indivíduos homozigóticos para o alelo *wt*

apresentam concentrações de endoxifeno 2.4 a 2.6 vezes maiores e concentrações de N-DMT 1.9 a 2.1 vezes menores do que indivíduos com genótipos $*10/*10$ e $*5/*10$, indivíduos com genótipo heterozigótico $wt/*5$ ou $wt/*10$ apresentam concentrações de endoxifeno 1.8 a 2.6 vezes maiores do que indivíduos $*10/*10$ e $*5/*10$. Não foram detectadas associações significativas entre polimorfismos nos genes CYP3A5, CYP2C9 e CYP2C19 e os níveis de tamoxifeno ou dos seus metabolitos (Lim *et al.*, 2011).

O primeiro estudo a correlacionar o genótipo CYP2D6 $*10$ e resultados terapêuticos provenientes da toma de tamoxifeno na população Chinesa foi em 2008. Neste estudo, as mulheres homozigóticas para o alelo variante T a tomar tamoxifeno tiveram menores concentrações de 4-OHT do que as mulheres com o genótipo wt/wt , ou seja, C/C. O genótipo variante T/T foi também associado a menor tempo livre de doença do que os genótipos T/C e C/C. Esta última associação não se verificou em mulheres que não tomaram tamoxifeno, o que indica que este polimorfismo não é um marcador prognóstico por si só. Os autores referem várias limitações de entre as quais não terem sido medidas as concentrações de endoxifeno e o facto de outras variantes alélicas do CYP2D6 ou mesmo polimorfismos de outros CYPs poderem ter interferido nos resultados (Xu *et al.*, 2008).

Na população Japonesa, chegou-se a resultados semelhantes ao serem estudadas 67 mulheres em monoterapia adjuvante com tamoxifeno. As mulheres com genótipo CYP2D6 $*10/*10$ tiveram menor tempo livre de doença até 10 anos após cirurgia do que mulheres com genótipo CYP2D6 $*1/*1$ (homozigótico para o tipo selvagem). O aumento do risco de recorrência pareceu depender do nº de alelos CYP2D6 $*10$ (K. Kiyotani *et al.*, 2008).

Contrariamente, em 2009 na mesma população, num estudo efectuado em 173 mulheres em tratamento com tamoxifeno como terapia adjuvante para o cancro de mama, não foi observada diferença significativa entre mulheres com genótipo $*10/*10$ e mulheres com genótipos wt/wt ou $wt/*10$ quanto ao parâmetro tempo livre de doença. Os mesmos resultados foram obtidos quando foram tidos em conta factores prognósticos conhecidos como tamanho do tumor, estado dos nódulos linfáticos, grau histológico, ER, PR. Os autores sugerem ainda que embora os genótipos homozigóticos para os alelos $*10$ ou $*4$ tenham sido associados a baixos níveis de metabolitos activos do tamoxifeno noutros

estudos, talvez estes sejam eficazes mesmo em baixas concentrações ou o próprio tamoxifeno tenha maior poder de inibição do crescimento do cancro da mama do que o assumido (Okishiro *et al.*, 2009). Também no estudo de Toyama *et al.* (2009) não foi encontrada uma correlação entre o genótipo CYP2D6*10 e resultados da terapia com tamoxifeno em mulheres Japonesas com cancro da mama ER- positivo sem envolvimento dos nódulos.

Na população tailandesa chegou-se à conclusão que mulheres com o genótipo T/T deste mesmo polimorfismo tiveram um tempo livre de doença significativamente menor do que mulheres com o genótipo heterozigótico (C/T). Esta associação não se observou entre mulheres com genótipo T/T e as com genótipo C/C, o que não corresponde ao esperado. Este foi o primeiro estudo a explorar esta associação em mulheres Tailandesas. A frequência do genótipo T/T para o CYP2D6*10 foi de 48.71% das doentes estudadas o que está de acordo com a frequência deste genótipo (40-50%) nas populações Asiáticas. Os autores referem algumas limitações de entre as quais o pequeno volume da amostra (Sirachainan *et al.*, 2012).

Kazuma Kiyotani *et al.* (2010) efectuaram um estudo com 282 mulheres Japonesas a tomar tamoxifeno como monoterapia, para determinar a associação entre o genótipo CYP2D6 e eficácia do tratamento demonstrada pelo tempo livre de doença. Os autores concluíram que mulheres com um ou ambos os alelos variantes tiveram um tempo livre de doença significativamente menor quando comparadas com homozigóticas *wt*, esta associação manteve-se quando se tiveram em conta o tamanho do tumor e estado dos nódulos linfáticos. Foi também verificado noutros 98 pacientes recrutados independentemente, que os níveis plasmáticos de endoxifeno e 4-OHT eram menores nas mulheres com genótipo *wt*/variante ou variante/variante em relação a mulheres CYP2D6 *wt/wt*.

Não foi encontrada uma relação significativa entre o genótipo CYP2D6 e resultados da terapia com tamoxifeno em 115 pacientes Caucasianas com cancro de mama. Concluiu-se que as mulheres PM, ou seja, com dois alelos nulos: CYP2D6 *3 (c.2549delA), *4 ou *5 ou concomitante toma de um inibidor do CYP2D6, demonstraram um reduzido tempo livre de doença embora não seja significativo. No entanto, ao considerar apenas

os pacientes ER- positivos, o genótipo CYP2D6 não foi associado com resultados terapêuticos (Newman *et al.*, 2008).

Em 2012, foi estudada a influência de ajustamentos de dose, em mulheres que não têm ou têm apenas um alelo normal do CYP2D6, nas concentrações plasmáticas dos metabolitos activos e na incidência de reacções adversas em 98 mulheres Japonesas com cancro de mama a tomar tamoxifeno. Concluiu-se que 8 semanas após o ajuste de dose, as concentrações plasmáticas de endoxifeno e 4-OHT de mulheres com genótipo CYP2D6 *1/*1 a tomar 20 mg de tamoxifeno diários foram similares às de mulheres com genótipo CYP2D6 *1/*10 ou *1/alelo nulo a tomar tamoxifeno na dose 30 mg/dia e às de mulheres com genótipo CYP2D6 *10/*10, *10/alelo nulo ou *41/alelo nulo a tomar 40 mg de tamoxifeno por dia. Estes resultados indicam que um apropriado aumento de dose de tamoxifeno é uma maneira eficaz de ultrapassar o problema de reduzida actividade enzimática. A incidência de efeitos adversos não mudou significativamente após o ajuste de dose (K. Kiyotani, Mushiroda, Imamura, *et al.*, 2012).

Schroth *et al.* (2009) fizeram uma análise retrospectiva de um estudo cohort alemão e um americano perfazendo 1325 pacientes com cancro de mama tratados com tamoxifeno durante 5 anos como terapêutica adjuvante, que segundo os autores, foi o primeiro estudo com impacto suficiente para demonstrar uma associação entre o genótipo CYP2D6 e resultados clínicos provenientes deste fármaco. Neste estudo cujo *follow-up* médio foi 6.3 anos, as taxas de recorrência calculadas foram 14.9% para EM, 20.9% para IM e 29.0% para PM, já as taxas de mortalidade foram 16.7%, 18.0% e 22.8% respectivamente. Os indivíduos com menor actividade CYP2D6 como os IM e PM tiveram menor tempo livre de doença quando comparados com indivíduos EM.

Regan *et al.* (2012) ao estudarem 1243 mulheres pós-menopáusicas que participaram no estudo BIG 1-98 (*Breast International Group*), concluíram que não foi observada uma associação entre o fenótipo CYP2D6 e tempo livre de doença em mulheres que receberam monoterapia com tamoxifeno durante 5 anos, pois apesar de em PM e IM ter havido menor tempo livre de doença em relação a EM, esta diferença não foi significativa. Adicionalmente, as PM e IM tiveram um risco acrescido significativo de desenvolvimento de afrontamentos induzidos pela terapêutica em relação às EM,

demonstrando-se associação contrária à hipótese entre fenótipo CYP2D6 e o efeito adverso referido.

Ao recorrer ao estudo ATAC (*Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination*), Rae *et al.* (2012) estudaram 588 mulheres pós-menopáusicas do Reino Unido a tomar tamoxifeno como terapia adjuvante. Após um *follow-up* médio de 10 anos dos doentes, não foi observada associação significativa entre o fenótipo CYP2D6 (baseados nos 7 alelos mais comuns: CYP2D6*1, *2, *3, *4, *6, *10 e *41) e resultados da terapia. Estes não se alteraram quando se procedeu a uma nova análise tendo em conta factores clinico-patológicos como tamanho do tumor, grau, estado dos nódulos linfáticos e idade.

Em 2013, Brooks *et al.* (2013) foram os primeiros a investigar a associação de variações genéticas em enzimas metabolizadores e o risco de cancro de mama contra-lateral em mulheres Caucasianas a tomar tamoxifeno. Foram estudadas 624 mulheres com um cancro de mama contra-lateral primário (casos) e 1199 mulheres com cancro de mama unilateral (controlos), sendo que ambos os grupos foram participantes do estudo WECARE (*Women's Environment Cancer and Radiation Epidemiology*). Depois da análise de 112 SNPs nos genes CYP2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A5, SULT1A1 e UGT2B15 não foram observadas associações significativas entre as variantes e risco de desenvolvimento cancro de mama contra-lateral quer em mulheres a tomar tamoxifeno, quer em mulheres que não tomaram tamoxifeno. Como limitações, os autores referiram a impossibilidade de saber a aderência referente ao tamoxifeno prescrito e a ausência de dados quanto a toma de outras medicações que possam afectar a eficácia do tamoxifeno.

Em 2011, foi efectuado um estudo em mulheres que desenvolveram cancro de mama invasivo ou não-invasivo enquanto tomavam tamoxifeno como terapêutica de prevenção durante 5 anos (consideradas casos) e mulheres que não desenvolveram cancro da mama (controlos) para determinar o impacto do genótipo CYP2D6, uso de medicação inibidora do CYP2D6 e fenótipo de metabolizador (genótipo CYP2D6 combinado com uso de inibidores de CYP2D6) no desenvolvimento da doença. Os autores chegaram à conclusão de que não existiu associação entre qualquer um destes parâmetros de metabolismo do CYP2D6 com ocorrência de cancro de mama (M. P. Goetz *et al.*, 2011).

Num estudo realizado em 2009, 297 mulheres registaram durante 12 meses *scores* baseados na frequência e severidade de afrontamentos devido à terapêutica com tamoxifeno. Depois de 4 meses de início de terapêutica, foi observada uma associação entre IM do CYP2D6 e maior média de *scores* de afrontamentos quando comparados com PM e EM. O facto de se verificar maior média do *score* de afrontamentos em IM, e não em EM, embora inesperado, pode ser explicado por reduzida aderência à terapia por EM. Para além disso, registou-se também aos 4 meses, uma tendência por parte dos PM em ter afrontamentos menos severos que os IM e EM (Henry *et al.*, 2009).

4.2 CYP2C9

Num estudo realizado em 2011, os autores analisaram a relação entre genótipos de várias enzimas metabólicas de entre as quais CYP2C9 e níveis plasmáticos de tamoxifeno e dos seus metabolitos em 236 mulheres Alemãs pós-menopáusicas. Conclui-se que portadores dos alelos de reduzida actividade CYP2C9*2 e *3 (430C>T e 1075A>C respectivamente) tiveram concentrações plasmáticas de 4-OHT e endoxifeno significativamente menores e que o rácio metabólico tamoxifeno/4-OHT foi superior em mulheres que possuem pelo menos um destes alelos, pelo contrário, o rácio metabólico N-DMT/endoxifeno não foi influenciado significativamente pelo genótipo presente. Estes resultados sugerem que o genótipo CYP2C9 tem um papel na formação de endoxifeno a partir do metabolito 4-OHT, o mesmo não acontece pela via do metabolito N-DMT (Murdter *et al.*, 2011).

Noutro estudo efectuado na mesma população, em doentes a tomar tamoxifeno como monoterapia adjuvante, chegou-se à conclusão de que os polimorfismos CYP2C9*2 e *3 não tiveram associação com tempo livre de doença (Schroth *et al.*, 2007).

4.3 CYP2C19

A ocorrência dos genótipos CYP2C19 *2/*2, *2/*3 e *3/*3, cujos alelos *2 (G681A) e *3 (G636A) codificam enzimas sem actividade, é relativamente elevada na população Japonesa contando com cerca de 20%. Num estudo em 2009, efectuado nesta população não foi detectada uma diferença significativa no tempo livre de doença entre mulheres

com genótipos PM (*2/*2, *2/*3 ou *3/*3 com tempo médio de *follow-up* de 63 meses) e genótipos EM (wt/wt, wt/*2 ou wt/*3 com tempo médio de *follow-up* de 54 meses), este resultado manteve-se quando se fez ajustamentos para certos factores prognósticos conhecidos (Okishiro *et al.*, 2009). Muito recentemente, também Markiewicz *et al.* (2013) analisaram o polimorfismo CYP2C19*2 também conhecido como rs4244285 na população Polaca não o tendo associado ao mesmo parâmetro.

Portadoras do polimorfismo CYP2C19*2 apresentaram uma taxa de sobrevivência ao cancro de mama significativamente superior comparativamente a portadoras do alelo wt, segundo um estudo efectuado em 2010 em 80 mulheres holandesas. Face a este resultado contra-intuitivo, pelo facto de o polimorfismo ser conhecido por dar origem a ausência de actividade enzimática, os autores referem várias limitações e explicações de entre as quais os resultados serem um acaso ou uma descoberta sem explicação etiológica, e referem a necessidade de mais estudos com maior amostra (Ruiter *et al.*, 2010).

Um ano mais tarde, os mesmos autores realizaram um estudo com mais impacto em 499 pacientes da mesma população, ER- positivas e com cancro de mama em estado avançado, reunidos de 3 estudos cohort Holandeses. À semelhança do estudo feito anteriormente, os pacientes com 1 ou 2 alelos CYP2C19*2 combinados mostraram um aumento significativo de tempo livre de doença comparando com pacientes sem o alelo, mesmo na análise multivariada (tendo em conta factores de entre os quais o genótipo CYP2D6*4). Adicionalmente, o alelo CYP2C19*17 (alelo que codifica enzima ultra rápida) foi significativamente associado a maior tempo livre de doença em 243 pacientes não-tratados (van Schaik *et al.*, 2011).

Na população Alemã observou-se também uma associação significativa entre o genótipo heterozigótico e homozigótico para o polimorfismo CYP2C19*17, alelo definido por 2 polimorfismos na zona promotora 806C>T e 3402C>T, e maior tempo livre de doença em doentes a tomar tamoxifeno como monoterapia adjuvante. Já nos polimorfismos CYP2C19*2 e *3 não foram detectadas quaisquer associações (Schroth *et al.*, 2007).

Moyer *et al.* (2011) analisaram em 190 mulheres pós-menopáusicas a fazer monoterapia com tamoxifeno no NCCTG (*North Central Cancer Treatment Group*), a hipótese do

polimorfismo CYP2C19*17 estar associado ao tempo livre de doença. Não encontrou no entanto uma relação entre o polimorfismo e o parâmetro referido, mesmo após ter em conta os factores: tamanho do tumor e estado dos nódulos linfáticos.

Num estudo realizado muito recentemente, foram analisadas 535 mulheres de nacionalidade holandesa pós-menopáusicas ER- positivas a tomar 30 mg de tamoxifeno por dia como terapêutica adjuvante ou sem tratamento adjuvante (pacientes controlo). O facto de mulheres apresentarem polimorfismo CYP2C19*17 não se demonstrou significativo no benefício da terapêutica com tamoxifeno, no entanto, mulheres com pelo menos um alelo CYP2C19*2 beneficiaram significativamente mais da terapia com tamoxifeno do que mulheres sem o polimorfismo. Pacientes controlo portadoras do alelo CYP2C19*2 tiveram pior tempo livre de doença quando comparadas com mulheres sem o polimorfismo, o que faz deste SNP um factor de prognóstico adverso, apesar de indicar maior benefício desta terapêutica. Quanto ao polimorfismo CYP2C19*17 não houve diferença no tempo livre de doença nos pacientes controlo (Beelen *et al.*, 2013).

4.4 CYP3A4

A frequência do alelo CYP3A4*1B (polimorfismo localizado na zona promotora também conhecido como rs2740574; A392G) é de 3.6 a 9.6% em populações Caucasianas. Em 2007, não foi identificada qualquer relação entre este alelo variante e os níveis de tamoxifeno, 4-OHT, N-DMT e endoxifeno no plasma de mulheres com cancro da mama a tomar tamoxifeno. Foi sugerido que mulheres em tratamento com tamoxifeno e portadoras do alelo CYP3A4*1B têm cerca de 3 vezes maior risco de desenvolver cancro do endométrio quando comparadas com mulheres que não seguem o tratamento. As hipóteses para explicar esta associação foram o efeito estrogénico do tamoxifeno no endométrio e o efeito genotóxico do metabolito α -OHT. Chu *et al.* (2007) referem ainda como limitação a reduzida amostra pelo que estes resultados devem ser confirmados.

Duas variantes genéticas inactivas do CYP3A4 são CYP3A4*3 e CYP3A4*17, caracterizadas por uma alteração T>C na posição 1473 que origina uma substituição

Met445Thr no exão 12 induzindo mudanças estruturais na enzima e uma mutação T>C no exão 7 respectivamente. Estas foram analisadas muito recentemente em conjunto com outro polimorfismo CYP3A4*1B num estudo, onde nenhuma destas variantes foi associada com uma mudança nos níveis de metabolitos do tamoxifeno em 135 pacientes Caucasianas de nacionalidade Espanhola (Fernandez-Santander *et al.*, 2013).

A variante CYP3A4*22, muito recentemente identificada, corresponde à substituição C>T no intrão 6 do respectivo gene. Este SNP foi estudado por Teft *et al.* (2013) em 196 mulheres a tomar tamoxifeno como terapeutica adjuvante nos Estados Unidos da América. Os resultados demonstraram que os portadores do alelo variante T possuíam níveis de tamoxifeno e dos seus metabolitos significativamente mais elevados do que as mulheres com genótipo C/C. Uma outra análise foi feita tendo em conta os fenótipos de metabolizadores em relação à enzima CYP2D6, tendo-se chegado a resultados semelhantes CYP2D6.

4.5 CYP3A5

O SNP CYP3A5*3 (rs776746) no intrão 3, razão pela qual o alelo é considerado nulo, é o principal alelo polimórfico do CYP3A5 e tem frequências de 95% em certas populações Europeias. Num estudo efectuado na população Espanhola em 2013, foi sugerido que o polimorfismo não influencia os níveis plasmáticos dos metabolitos do tamoxifeno. Os autores referem não ter sido observado o genótipo wt/wt e a necessidade de mais estudos deste polimorfismo com maior número de doentes envolvidos (Fernandez-Santander *et al.*, 2013).

Em 2005, Jin *et al.* (2005) estudaram o efeito do polimorfismo CYP3A5*3 nas concentrações plasmáticas de endoxifeno de mulheres a tomar tamoxifeno há 4 meses. Apesar de não existir uma diferença significativa, as concentrações plasmáticas médias de endoxifeno foram mais elevadas para mulheres que apresentaram pelo menos um alelo funcional. Neste estudo as frequências alélicas para o CYP3A5*1 e CYP3A5*3 foram 12% e 88% respectivamente.

No mesmo ano, num estudo em que participaram 48 mulheres Afro-americanas e 50 Caucasianas não foram observadas quaisquer alterações nos níveis de tamoxifeno ou dos seus metabolitos em mulheres que apresentavam o polimorfismo CYP3A5*3 ou CYP3A5*6 (G14690A). Adicionalmente não foram encontradas associações significativas entre os polimorfismos e efeitos adversos do tamoxifeno reportados. Foi observado uma distribuição racial marcada destes polimorfismos, corroborando vários estudos anteriores. Neste estudo, mulheres Caucasianas tinham 26 vezes maior probabilidade de serem portadoras do polimorfismo CYP3A5*3 do que mulheres Afro-americanas e estas últimas tinham 9 vezes maior probabilidade de serem portadoras do polimorfismo CYP3A5*6 (Tucker *et al.*, 2005).

Ainda noutro estudo realizado em 2005, nos Estados Unidos da América não foram encontradas mudanças no tempo livre de doença de acordo com existência ou ausência do polimorfismo CYP3A5*3 em mulheres pós-menopáusicas a tomar tamoxifeno. Não houve também associação entre o genótipo CYP3A5 e a severidade de afrontamentos (M. P. Goetz *et al.*, 2005). Similarmente, num estudo realizado muito recentemente na Tailândia em mulheres a tomar tamoxifeno como terapêutica adjuvante não foi observado qualquer impacto do genótipo CYP3A5*3 no tempo livre de doença (Sensorn *et al.*, 2013).

No entanto, num estudo em mulheres pós-menopáusicas de nacionalidade Sueca com um *follow-up* médio de 7.3 anos, concluiu-se que no grupo que tomou o fármaco durante 5 anos como terapêutica adjuvante, as mulheres homozigóticas para a variante CYP3A5*3 tiveram significativamente melhores resultados quando comparadas com mulheres que possuíam o alelo CYP3A5*1. Este resultado não vai de encontro ao esperado, uma vez que este genótipo representa a forma inactiva da enzima não contribuindo para a formação do metabolito primário N-desmetil-tamoxifeno, precursor do metabolito activo principal endoxifeno. Os autores do estudo revelam incertezas quanto à relevância do estudo tendo em conta o limitado número de pacientes envolvidos (P. Wegman *et al.*, 2007).

4.6 SULT1A1

O polimorfismo SULT1A1*2 é caracterizado por uma mudança do aminoácido Arg para His na posição 213 do exão 7 do respectivo gene. A proteína resultante desta variação apresenta uma capacidade catalítica 2 vezes menor bem como uma redução da sua termoestabilidade. Num estudo realizado em 2002 chegaram à conclusão que mulheres homozigóticas para o polimorfismo SULT1A1*2 apresentavam reduzido tempo livre de doença quando comparadas com mulheres heterozigóticas ou de genótipo *1/*1. Esta associação manteve-se mesmo quando se realizaram ajustes em factores clínicos. Estes resultados não correspondem ao esperado aumento da eficácia da terapêutica devido à redução da *clearance* do metabolito activo 4-OHT. Apesar de tudo, os autores acreditam que exista uma justificação biológica para estes resultados. No entanto não é excluída a hipótese de que os resultados obtidos se devam a outro polimorfismo não definido até à data (S. Nowell *et al.*, 2002).

Em 2010, face aos resultados contra-intuitivos da associação entre o aumento do tempo livre de doença e o alelo de alta actividade SULT1A1*1, os mesmos autores realizaram um estudo *in vitro* para esclarecer a contribuição da enzima para a eficácia terapêutica do tamoxifeno. Concluiu-se que a expressão do SULT1A1 nas células do cancro da mama aumenta o efeito do 4-OHT nestas, o que revela a possibilidade de existência de um papel para este metabolito quando sulfatado na actuação do fármaco nas células tumorais (Mercer *et al.*, 2010).

Uma vez que a actividade do SULT1A1 foi correlacionada com o número de cópias do gene, Moyer *et al.* (2011) avaliaram a associação entre o CNV (*Copy Number Variations*) do SULT1A1 e tempo livre de doença num estudo realizado em mulheres pós-menopáusicas no NCCTG (*North Central Cancer Treatment Group*) a fazer monoterapia com tamoxifeno. Não foram identificadas associações entre a variação genética em estudo e o parâmetro, nem mesmo agrupando as mulheres por actividade das enzimas CYP2D6.

Também em 2008, num estudo efectuado em 151 mulheres Caucasianas com cancro da mama a tomar tamoxifeno, não foi detectada uma associação entre os genótipos de

SULT1A1 ou o número de cópias do gene com as concentrações plasmáticas dos metabolitos activos do tamoxifeno. É referido ainda que estes resultados podem dever-se ao facto dos UGTs também representarem uma via de inactivação destes mesmos metabolitos (Gjerde *et al.*, 2008).

Serrano *et al.* (2011) realizaram um estudo recorrendo ao ensaio *Italian Tamoxifen Prevention Trial* para seleccionar 182 mulheres Caucasianas a tomar tamoxifeno durante 5 anos como terapêutica preventiva. Das mulheres seleccionadas, 47 desenvolveram cancro de mama e 135 mulheres não desenvolveram a doença, sendo consideradas controlos. Não foram detectadas diferenças entre os genótipos SULT1A1 e o risco de desenvolver cancro de mama.

4.7 UGT1A8, UGT2B7 e UGT2B15

Num estudo *in vitro*, em 2009, numa análise recorrendo às mesmas linhas celulares concluiu-se que a variante UGT1A8^{173Ala/277Tyr} não exibiu actividade de glucoronidação detectável do 4-OHT e endoxifeno, a variante UGT1A8^{173Gly/277Cys} não teve actividade de glucoronidação significativamente diferente em relação à respectiva enzima do tipo selvagem (UGT1A8^{173Ala/277Cys}) e a variante UGT2B7^{268Tyr} exibiu actividade 2 e 5 vezes menores para o 4-OHT e endoxifeno respectivamente, quando comparada com a enzima do tipo selvagem (UGT2B7^{268His}). Este resultado foi concordante com a análise de espécimes microssomais de fígado humano (HLM) que evidenciou uma tendência significativa para a diminuição da glucoronidação de 4-OHT e endoxifeno com o aumento do número de alelos UGT2B7^{268Tyr}. Embora a prevalência do polimorfismo seja baixa em Caucasianos (cerca de 2%), o facto de a enzima UGT1A8 ser muito activa para os metabolitos do tamoxifeno e ser expressa no tecido mamário sugere que o polimorfismo do codão 277 do gene pode ser importante para a resposta ao tamoxifeno, à semelhança do polimorfismo no codão 268 do UGT2B7 (Blevins-Primeau *et al.*, 2009).

Apesar dos resultados dos estudos *in vitro*, em 2011, mulheres Dinamarquesas foram estudadas de modo a analisar a existência de associação entre os polimorfismos UGT1A8*3 (rs17863762 causando Cys277Tyr), UGT2B7*2 (rs7439366 causando

His268Tyr) e UGT2B15*2 (rs1902023 causando Asp85Tyr) e tempo livre de doença em mulheres: 1) cujos tumores primários eram ER-positivos e tomaram tamoxifeno pelo menos por um ano; 2) cujos tumores primários eram ER- negativos, não tomaram tamoxifeno e sobreviveram pelo menos um ano depois do diagnóstico. Em ambos os grupos ER+/Tam+ e ER-/Tam- não foram verificadas associações entre os SNPs UGT1A8*3 (UGT1A8^{277Tyr}), UGT2B7*2 (UGT2B7^{268Tyr}) e UGT2B15*2 (UGT2B15^{85Tyr}) e tempo livre de doença, mesmo quando se teve em conta o genótipo CYP2D6*4 (Ahern *et al.*, 2011).

Ao recorrer ao estudo ATAC, Rae *et al.* (2012) estudaram 603 mulheres pós-menopáusicas do Reino Unido a tomar tamoxifeno como terapia adjuvante, nas quais analisaram a relação entre o genótipo UGT2B7 e taxa de recorrência. Não foi observada qualquer diferença significativa entre portadores do alelo *wt* e portadores do alelo UGT2B7*2 (UGT2B7^{268Tyr}) em relação a taxa de recorrência. Estes resultados mantiveram-se quando se procedeu a uma nova análise tendo em conta factores clinico-patológicos como tamanho do tumor, grau, estado dos nódulos linfáticos e idade.

Noutro estudo em mulheres pós-menopáusicas de nacionalidade Sueca com um *follow-up* médio de 7.3 anos, não se verificou, mais uma vez, qualquer tipo de influência do SNP UGT2B15*2 (UGT2B15^{85Tyr}) no tempo livre de doença verificado nas mulheres a tomar tamoxifeno para o cancro de mama (P. Wegman *et al.*, 2007).

4.8 ABCB1, ABCC2 e ABCG2

Teh *et al.* (2012) ao estudarem 95 pacientes com cancro de mama a tomar tamoxifeno na Malásia observaram que os pacientes com genótipo C/C quanto ao polimorfismo ABCB1 C3435T (que ocorre no exão 26 do gene que codifica a enzima ABCB1 também chamada glicoproteína P) tiveram menor tempo livre de doença do que os indivíduos com os genótipos C/T e T/T, embora esta associação não seja significativa. A mesma relação foi observada em pacientes com genótipos G/A, G/T e A/T para o polimorfismo ABCB1 G2677A/T que tiveram uma diminuição não significativa do tempo livre de doença em relação ao genótipo G/G.

Pelo contrário, muito recentemente na população Tailandesa foi encontrada uma associação entre as mulheres com o genótipo heterozigótico ABCB1 C3435T e o parâmetro tempo livre de doença. De facto, os resultados revelam um menor tempo livre de doença para as mulheres com genótipo C/T do que as mulheres homozigóticas para o alelo do tipo selvagem C/C, no entanto, as mulheres homozigóticas para o alelo variante não demonstraram diferenças clinicas em relação às homozigóticas do tipo selvagem. É referido pelos autores que esta correlação deve ser confirmada em estudos com maiores amostras. Já no gene ABCC2 não foram encontradas associações entre os polimorfismos ABCC2*1C (rs717620) que provoca menor actividade promotora e rs3740065 do ABCC2 (A68231G) com tempo livre de doença. Nesta população, a frequência dos genótipos ABCC2*1/*1 e *1/*1C foi de 57% e 43% respectivamente, já para os genótipos ABCC2 68231 A/A e A/G foram de 47% e 53% (Sensorn *et al.*, 2013).

Kazuma Kiyotani *et al.* (2010) ao estudarem 51 SNPs nos genes dos transportadores ABCB1, ABCC2 e ABCG2 em 282 mulheres Japonesas a tomar tamoxifeno como monoterapia com um *follow-up* de 7.1 anos, descobriram que apenas o polimorfismo rs3740065 (A68231G, localizado no intrão 29) do gene ABCC2 demonstrou ter associação significativa com tempo livre de doença. Ao contrário do estudo recente de Sensorn *et al.* (2013), os autores concluíram que o alelo A do polimorfismo é um alelo de risco para recorrência da doença. Apesar disso, não se verificou uma relação entre o polimorfismo rs3740065 e níveis plasmáticos de endoxifeno. Foi sugerido que o alelo A ou outras variantes genéticas ligadas a este podem estar associados com aumentos dos níveis de expressão ou actividade dos transportadores ABCC2 no tecido de cancro mamário causando menor exposição deste ao endoxifeno.

4.9 ESR1 e ESR2

No gene ESR1 (*Estrogen Receptor-1*) ou ESR α , localizado no 6q25.1 existem vários polimorfismos já descritos. O SNP PvuII é caracterizado por uma substituição do nucleótido T por C a 397 bp antes do exão 2 e o SNP XbaI por uma substituição do nucleótido A por G a 351bp antes do exão 2, ambos localizados no primeiro intrão. No

gene ESR2 (*Estrogen Receptor-2*) ou ESR β , o SNP rs498693 ou ESR2-02 origina uma substituição de A por G (Yan Jin *et al.*, 2008).

Num estudo realizado em 2008 observou-se que mulheres pré-menopáusicas com o haplótipo CG (variante para os polimorfismos ESR1 PvuII e ESR2-02) tinham maior *score* de afrontamentos (baseado em frequência e severidade) antes de começar o tratamento com tamoxifeno. Após começar a terapêutica, as mulheres pós-menopáusicas homozigóticas ESR1 PvuII C/C e ESR2-02 G/G tiveram maior aumento no *score* de afrontamentos do que as restantes mulheres pós-menopáusicas. Foi também encontrada uma associação entre mulheres com genótipo ESR2-02 A/A e menor risco de ter afrontamentos induzidos pela terapêutica com tamoxifeno quando comparadas com mulheres com genótipos A/G e G/G, o facto de serem pré ou pós-menopáusicas não teve qualquer influência neste resultado (Yan Jin *et al.*, 2008).

Onitilo *et al.* (2009) foram os primeiros a sugerir que o genótipo ESR1 XbaI está associado com trombose venosa profunda e embolismo pulmonar induzidos pela terapêutica com tamoxifeno, constatando que indivíduos com o genótipo A/A tinham menor probabilidade de sofrer destes efeitos adversos do que os indivíduos com genótipo G/G ou A/G. Esta associação manteve-se quando tiveram em conta factores de risco conhecidos como idade e obesidade. Já os polimorfismos do ESR1 PvuII e ESR2 não demonstraram qualquer tipo de associação com estes efeitos adversos.

Num estudo recente verificou-se que a presença de homozigotia para alelo *wt* do ESR1 PvuII combinada com pelo menos um alelo *wt* do UGT2B15 estava associada com um decréscimo de tempo livre de doença (Markiewicz *et al.*, 2013).

Yoneda *et al.* (2002) estudaram a influência dos polimorfismos genéticos do ER α e ER β no efeito que o tamoxifeno, como terapia adjuvante, tem no osso. Esta análise foi efectuada em 21 mulheres Japonesas com cancro da mama e pós-menopáusicas. Dos polimorfismos: repetições dinucleotídeas TA na região promotora, PvuII e XbaI no gene do ER α e repetições dinucleotídeas CA no intrão 5 do gene do ER β , destes, apenas o último se mostrou estar associado com a densidade mineral óssea da espinha lombar aos 12 meses após o início do tratamento. Portadores do alelo com 21 repetições CA

demonstraram ter densidade mineral óssea significativamente superior aos não portadores. Foi mencionado como limitação o número reduzido de pacientes analisados.

Ntukidem *et al.* (2008) estudaram o efeito do tamoxifeno nas concentrações de lípidos em 176 mulheres com cancro de mama a tomar tamoxifeno durante 4 meses. Concluiu-se que mulheres pós-menopáusicas com genótipo ESR1 XbaI G/G tiveram uma diminuição significativamente maior dos níveis de colesterol total em relação aos genótipos A/A e A/G. Concluíram também que nas mulheres pré-menopáusicas com o genótipo A/A para ESR1 XbaI tiveram um decréscimo das concentrações médias de triglicéridos e aumento das concentrações médias de HDL, e no genótipo G/G verificou-se o contrário. Quanto ao polimorfismo ESR2-02, o genótipo G/G foi correlacionado com o aumento das concentrações de triglicéridos tanto em mulheres pré- como pós-menopáusicas, estando ainda o genótipo A/A associado a uma diminuição destes em mulheres pós-menopáusicas. Não foi detectada qualquer associação entre o genótipo ER α PvuII e alterações dos níveis séricos de lípidos. As associações observadas foram diferentes entre mulheres pré-menopáusicas e pós-menopáusicas, uma possível explicação para tal facto é as concentrações de estrogénio endógeno em mulheres pré-menopáusicas poderem encobrir os efeitos estrogénicos do tamoxifeno e dos seus metabolitos sendo portanto estes efeitos mais visíveis em mulheres pós-menopáusicas.

Dois anos mais tarde, foi estudado novamente o efeito estrogénico do tamoxifeno nos níveis séricos de lípidos. Os autores observaram tal como no estudo anterior, que o genótipo ESR2-02 está associado a alterações nos níveis de triglicéridos e que nem o genótipo ESR1 PvuII, nem o genótipo CYP2D6 estão associados com alterações nas concentrações séricas de lípidos em mulheres a tomar tamoxifeno. Pelo contrário, não encontraram qualquer associação entre o genótipo ESR1 XbaI e as concentrações de lípidos (Hayes *et al.*, 2010).

5. Conclusão

Depois da análise de todos os estudos descritos nesta revisão bibliográfica é visível a existência de certos genes mais controversos que outros quanto à sua influência na resposta ao tratamento com tamoxifeno.

Foram vários os estudos onde se chegou à conclusão de que os polimorfismos para actividade nula/reduzida do CYP2D6 estão significativamente associados a reduzidas concentrações dos metabolitos activos do fármaco ou menor tempo livre de doença. No entanto houve também estudos cujos resultados indicaram ausência de associação ou mesmo a associação contrária no caso Pia Wegman *et al.* (2005) que sugeriu que o alelo *4 estava associado a menor risco de recorrência na população Sueca.

Nos estudos com mais impacto devido a maiores amostras referentes ao CYP2D6, apenas o estudo realizado por Schroth *et al.* (2009) demonstrou associação significativa, tendo os indivíduos PM e IM piores resultados provenientes da terapêutica quando comparados com EM. Os restantes não observaram associação significativa quanto a resultados terapêuticos. Quanto a reacções adversas, foi observado num destes a relação contra-intuitiva de indivíduos PM e IM apresentarem maior risco de desenvolvimento de afrontamentos que os EM.

Apesar de vários autores considerarem que está implícita a relação entre baixas concentrações dos metabolitos activos do tamoxifeno e piores resultados terapêuticos, num estudo com impacto de Madlensky *et al.* (2011) não se verificou uma associação linear entre estes, sugerindo a existência de um limite mínimo de concentração de endoxifeno a partir do qual se alcança o efeito protector do fármaco. Para um maior esclarecimento futuro sobre a importância clínica de baixas concentrações deste metabolito são necessários mais estudos com impacto.

A escassez de estudos farmacogenéticos sobre o CYP2C9 não permite tirar conclusões quanto à influência dos seus polimorfismos nos resultados da terapia com este fármaco. Nas populações Japonesa, Alemã e Polaca não se verificaram influências do polimorfismo CYP2C19*2 no tratamento com tamoxifeno, no entanto em estudos de

maior impacto na população Holandesa verificaram-se maiores taxas de sobrevivência e maior tempo livre de doença nas mulheres com o referido alelo. Os estudos onde foi analisado o polimorfismo CYP2C19*3 não referem qualquer tipo de associação. O alelo CYP2C19*17 que origina a enzima de actividade aumentada foi associado a melhores resultados provenientes da terapêutica com este fármaco na população Alemã mas em 2 estudos com mais impacto na população Holandesa tiveram resultados diferentes deste e entre si. No estudo de van Schaik *et al.* (2011) referem um valor prognóstico para melhores resultados da terapêutica enquanto Beelen *et al.* (2013) refere inexistência de valor prognóstico e simultaneamente inexistência de correlação com os resultados terapêuticos.

Nos polimorfismos descritos no gene CYP3A4, o recém-descrito CYP3A4*22 demonstrou influenciar a resposta terapêutica com tamoxifeno, sendo que o alelo variante (T) foi associado a maiores concentrações de tamoxifeno e dos seus metabolitos. O polimorfismo CYP3A4*1B foi associado a aumento do risco de desenvolver cancro do endométrio.

Dos estudos referentes ao CYP3A5 incluídos nesta revisão bibliográfica, apenas no estudo de P. Wegman *et al.* (2007) se observou associação entre o genótipo CYP3A5 e resultados provenientes da toma de tamoxifeno. A associação observada foi inesperada pois o alelo *3 (que codifica para actividade nula da enzima) não deveria, em teoria, levar a melhores resultados da terapia.

Foram também revistos alguns estudos quanto ao SULT1A1, tendo sido estudado o genótipo SULT1A1 e o número de cópias do gene. Apenas os autores de S. Nowell *et al.* (2002) (os mesmos que Mercer *et al.* (2010)) referiram uma associação, sendo esta entre o polimorfismo SULT1A1*2 e menor tempo livre de doença, o que foi inesperado face à menor capacidade catalítica da enzima originada pelo SNP. Foi revelado mais tarde, através de um estudo *in vitro*, que os produtos da sulfatação do metabolito 4-OHT poderão ser activos biologicamente o que seria uma possível explicação para os resultados anteriormente vistos.

Apesar de um estudo *in vitro* reconhecer alterações na actividade das enzimas UGT1A8 e UGT2B7 devido a mutações nos respectivos genes, estas não revelaram relevância na taxa de recorrência da patologia e no tempo livre de doença em mulheres a tomar tamoxifeno. Também não foi verificada qualquer correlação entre o polimorfismo UGT2B15*2 (UGT2B15^{85Tyr}) e resultados da terapia com este fármaco.

Nos transportadores ABC foram estudados vários polimorfismos sendo os resultados destes contraditórios entre as populações da Malásia, da Tailândia e do Japão. Na população Tailandesa o genótipo ABCB1 C/T (quanto ao polimorfismo C3435T) demonstrou estar associado a menor tempo livre de doença (sendo inesperado os genótipos homozigóticos *wt* e variante terem resultados semelhantes), o mesmo não se verificou nas restantes populações. Também na população Japonesa se verificou que o alelo A do gene ABCC2 estava associado a maior risco de recorrência não se observando a mesma associação na população Tailandesa.

Ao nível dos receptores de estrogénio vale a pena salientar que os polimorfismos destes têm um papel importante na modulação da resposta terapêutica ao nível de efeitos secundários e reacções adversas. Os genótipos C/C e G/G para os polimorfismos ESR1 PvuII e ESR2-02 respectivamente foram associados a maiores *scores* de afrontamentos induzidos pela toma de tamoxifeno, o genótipo ESR1 XbaI A/A foi associado a menor risco de sofrer de trombose venosa profunda. As repetições dinucleotídeas CA no intrão 5 do gene do Erβ foi o único polimorfismo estudado a demonstrar associação com a densidade mineral óssea da espinha lombar dos pacientes, sendo mulheres portadoras do alelo de 21 repetições dinucleotídeas CA demonstraram ter densidade óssea significativamente maior. Tanto o polimorfismo ESR1 XbaI como o ESR2-02 demonstraram influenciar os níveis plasmáticos dos lípidos assim como o estado menopáusico das mulheres que tomaram o fármaco. Por fim, a associação do genótipo ESR1 PvuII T/T com a presença do alelo *wt* UGT2B15 demonstrou menor tempo livre de doença nos indivíduos que apresentam estes genótipos.

Várias limitações foram referidas pelos autores, de entre as quais a mais frequente é o reduzido tamanho da amostra. De facto ao analisar certos estudos com mais impacto devido a amostras maiores conclui-se que estes não corroboram os resultados obtidos em estudos com amostras reduzidas (como é o caso dos estudos referentes ao CYP2D6).

O facto de os resultados poderem ser influenciados por outros polimorfismos noutras genes não analisados nos estudos é outra limitação referida nesta revisão bibliográfica, para a qual Mugundu, Sallans, Guo, Shaughnessy, and Desai (2012) sugerem investigações *in vitro* para contornar este problema. Outras limitações provêm da negligência de factores que podem explicar a incongruência dos resultados entre os vários estudos, sendo estas referentes à metodologia dos estudos, como a ausência de informação sobre a toma concomitante de fármacos inibidores do CYP2D6, ausência de informação sobre tratamentos para o cancro da mama a que os pacientes se submeteram, diferenças na dosagem de tamoxifeno dada aos pacientes, duração do tratamento, tempo de *follow-up*, erros na genotipagem, divergência nas características dos pacientes como estado menopáusico, idade e raça/etnia.

A existência de resultados contraditórios pode dever-se então ao facto de não se ter em conta numerosos factores que contribuem simultaneamente para a variabilidade na eficácia e toxicidade do tamoxifeno, levando à inviabilidade dos estudos, não alcançando assim o grau de evidência desejado para recomendar genotipagens aquando da decisão sobre a toma deste fármaco.

Existem testes farmacogenéticos comercializados para detectar variações genéticas, mas as questões sobre o facto de estes deverem ser utilizados a nível clínico e como interpretar os resultados obtidos permanecem em aberto (Westbrook & Stearns, 2013).

Apesar das associações observadas nos estudos descritos nesta monografia é imprudente considera-las de carácter definitivo. São necessários estudos com maiores amostras e que tenham em conta mais factores que possam influenciar os resultados por forma a evitar inviabilizar os estudos para chegar a conclusões mais elucidativas quanto à influência da variabilidade genética no tratamento com tamoxifeno.

Ao elaborar esta monografia deparei-me com várias dificuldades entre as quais a diferença na quantidade de estudos que analisaram os polimorfismos da enzima CYP2D6 (provavelmente devido às diferenças de resultados e importância no metabolismo do fármaco) face à escassez de estudos para as restantes proteínas envolvidas na farmacocinética do fármaco.

Bibliografia

- Abdulkareem, I. H., & Zurmi, I. B. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. *Niger J Clin Pract*, 15(1), 9-14. doi: 10.4103/1119-3077.94088
- Ahern, T. P., Christensen, M., Cronin-Fenton, D. P., Lunetta, K. L., Soiland, H., Gjerde, J., . . . Hamilton-Dutoit, S. (2011). Functional polymorphisms in UDP-glucuronosyl transferases and recurrence in tamoxifen-treated breast cancer survivors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20(9), 1937-1943. doi: 10.1158/1055-9965.epi-11-0419
- Anothaisintawee, T., Wiratkapun, C., Lerdsitthichai, P., Kasamesup, V., Wongwaisayawan, S., Srinakarin, J., . . . Thakkinstian, A. (2013). Risk factors of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Asia Pac J Public Health*, 25(5), 368-387. doi: 10.1177/1010539513488795
- Beelen, K., Opdam, M., Severson, T. M., Koornstra, R. H., Vincent, A. D., Hauptmann, M., . . . Linn, S. C. (2013). CYP2C19 2 predicts substantial tamoxifen benefit in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant tamoxifen and no systemic treatment. *Breast Cancer Res Treat*, 139(3), 649-655. doi: 10.1007/s10549-013-2568-0
- Blevins-Primeau, A. S., Sun, D., Chen, G., Sharma, A. K., Gallagher, C. J., Amin, S., & Lazarus, P. (2009). Functional significance of UDP-glucuronosyltransferase variants in the metabolism of active tamoxifen metabolites. *Cancer Res*, 69(5), 1892-1900. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-3708
- Boughey, J. C., Buzdar, A. U., & Hunt, K. K. (2008). Recent advances in the hormonal treatment of breast cancer. *Curr Probl Surg*, 45(1), 13-55. doi: 10.1067/j.cpsurg.2007.10.004
- Bradford, L. D. (2002). CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics*, 3(2), 229-243. doi: 10.1517/14622416.3.2.229
- Brauch, H., & Schwab, M. (2013). Prediction of tamoxifen outcome by genetic variation of CYP2D6 in postmenopausal women with early breast cancer. *Br J Clin Pharmacol*. doi: 10.1111/bcp.12229
- Brooks, J. D., Teraoka, S. N., Malone, K. E., Haile, R. W., Bernstein, L., Lynch, C. F., . . . Figueiredo, J. C. (2013). Variants in tamoxifen metabolizing genes: a case-

- control study of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 4(1), 35-48.
- Bruening, W., Schoelles, K., Treadwell, J., Launder, J., Fontanarosa, J., & Tipton, K. (2009). *Comparative Effectiveness of Core-Needle and Open Surgical Biopsy for the Diagnosis of Breast Lesions*. Rockville MD.
- Cardoso, M. J., Orvalho, M. d. L., & Oliveira, C. d. (2009). Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama. *DGS - Direcção Geral de Saúde*.
- Carlson, R., Edge, S., & Theriault, R. (2013). NCCN: Breast cancer. *NCCN Clinical practice guidelines in Oncology (NCCN Guidelines)*(Version 3.2013).
- Chu, W., Fyles, A., Sellers, E. M., McCready, D. R., Murphy, J., Pal, T., & Narod, S. A. (2007). Association between CYP3A4 genotype and risk of endometrial cancer following tamoxifen use. *Carcinogenesis*, 28(10), 2139-2142. doi: 10.1093/carcin/bgm087
- Clemons, M., Danson, S., & Howell, A. (2002). Tamoxifen ("Nolvadex"): a review. *Cancer Treat Rev*, 28(4), 165-180.
- Cotran, R. S., Kumar, V., & Robbins, S. L. (1994). *Robbins pathologic basis of disease* (5ª Edição ed.): Saunders.
- D'Abreo, N., & Hindenburg, A. A. (2013). Sex hormone receptors in breast cancer. *Vitam Horm*, 93, 99-133. doi: 10.1016/b978-0-12-416673-8.00001-0
- Deenen, M. J., Cats, A., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. (2011). Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *Oncologist*, 16(6), 820-834. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0259
- Del Re, M., Michelucci, A., Simi, P., & Danesi, R. (2012). Pharmacogenetics of anti-estrogen treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 38(5), 442-450. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.08.003
- DeVita, V. T., Hellman, S., & Rosenberg, S. A. (1997). *Cancer: principles and practice of oncology* (Autores Ed. 5ª Edição ed.): Lippincott Williams & Wilkins.
- Dumitrescu, R. G., & Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, 9(1), 208-221.
- Edge, S. B., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F. L., & Trotti, A. (2010). *AJCC Cancer staging manual* (Autores Ed. 7ª Edição ed.): Springer.
- Edlich, R., Winters, K. L., & Lin, K. Y. (2005). Breast cancer and ovarian cancer genetics. *Journal of long-term effects of medical implants*, 15(5).

- Fernandez-Santander, A., Gaibar, M., Novillo, A., Romero-Lorca, A., Rubio, M., Chicharro, L. M., . . . Bandres, F. (2013). Relationship between genotypes Sult1a2 and Cyp2d6 and tamoxifen metabolism in breast cancer patients. *PLoS One*, 8(7), e70183. doi: 10.1371/journal.pone.0070183
- Folkerd, E., & Dowsett, M. (2013). Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *Breast*, 22S2, S38-S43. doi: 10.1016/j.breast.2013.07.007
- Gjerde, J., Hauglid, M., Breilid, H., Lundgren, S., Varhaug, J. E., Kisanga, E. R., . . . Lien, E. A. (2008). Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism. *Ann Oncol*, 19(1), 56-61. doi: 10.1093/annonc/mdm434
- Goetz, M. P., Knox, S. K., Suman, V. J., Rae, J. M., Safgren, S. L., Ames, M. M., . . . Lingle, W. L. (2007). The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast cancer research and treatment*, 101(1), 113-121.
- Goetz, M. P., Rae, J. M., Suman, V. J., Safgren, S. L., Ames, M. M., Visscher, D. W., . . . Ingle, J. N. (2005). Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol*, 23(36), 9312-9318. doi: 10.1200/jco.2005.03.3266
- Goetz, M. P., Schaid, D. J., Wickerham, D. L., Safgren, S., Mushiroda, T., Kubo, M., . . . Ames, M. M. (2011). Evaluation of CYP2D6 and efficacy of tamoxifen and raloxifene in women treated for breast cancer chemoprevention: results from the NSABP P1 and P2 clinical trials. *Clin Cancer Res*, 17(21), 6944-6951. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-11-0860
- Hammer, C., Fanning, A., & Crowe, J. (2008). Overview of breast cancer staging and surgical treatment options. *Cleve Clin J Med*, 75 Suppl 1, S10-16.
- Hayes, D. F., Skaar, T. C., Rae, J. M., Henry, N. L., Nguyen, A. T., Stearns, V., . . . Flockhart, D. A. (2010). Estrogen receptor genotypes, menopausal status, and the effects of tamoxifen on lipid levels: revised and updated results. *Clin Pharmacol Ther*, 88(5), 626-629. doi: 10.1038/clpt.2010.143
- Henry, N. L., Rae, J. M., Li, L., Azzouz, F., Skaar, T. C., Desta, Z., . . . Stearns, V. (2009). Association between CYP2D6 genotype and tamoxifen-induced hot flashes in a prospective cohort. *Breast Cancer Res Treat*, 117(3), 571-575. doi: 10.1007/s10549-009-0309-1

- Hertz, D. L., McLeod, H. L., & Irvin, W. J., Jr. (2012). Tamoxifen and CYP2D6: a contradiction of data. *Oncologist*, 17(5), 620-630. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0418
- Higgins, M. J., & Stearns, V. (2010). CYP2D6 polymorphisms and tamoxifen metabolism: clinical relevance. *Current oncology reports*, 12(1), 7-15.
- Higgins, M. J., & Stearns, V. (2011). Pharmacogenetics of endocrine therapy for breast cancer. *Annu Rev Med*, 62, 281-293. doi: 10.1146/annurev-med-070909-182545
- Howell, A. (2006). Fulvestrant ('Faslodex'): current and future role in breast cancer management. *Crit Rev Oncol Hematol*, 57(3), 265-273. doi: 10.1016/j.critrevonc.2005.08.001
- Huber, P. C., Maruiama, C. H., & Almeida, W. P. (2010). Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. *Quim Nova*, 33, 1-7.
- Hulka, B. S., & Stark, A. T. (1995). Breast cancer: cause and prevention. *Lancet*, 346(8979), 883-887.
- Jancova, P., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2010). Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 154(2), 103-116.
- Jin, Y., Desta, Z., Stearns, V., Ward, B., Ho, H., Lee, K. H., . . . Flockhart, D. A. (2005). CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Natl Cancer Inst*, 97(1), 30-39. doi: 10.1093/jnci/dji005
- Jin, Y., Hayes, D. F., Li, L., Robarge, J. D., Skaar, T. C., Philips, S., . . . Lemler, S. (2008). Estrogen receptor genotypes influence hot flash prevalence and composite score before and after tamoxifen therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(36), 5849-5854.
- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Imamura, C. K., Hosono, N., Tsunoda, T., Kubo, M., . . . Skaar, T. C. (2010). Significant effect of polymorphisms in CYP2D6 and ABCC2 on clinical outcomes of adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, 28(8), 1287-1293.
- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Imamura, C. K., Tanigawara, Y., Hosono, N., Kubo, M., . . . Zembutsu, H. (2012). Dose-adjustment study of tamoxifen based on CYP2D6 genotypes in Japanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 131(1), 137-145. doi: 10.1007/s10549-011-1777-7

- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Nakamura, Y., & Zembutsu, H. (2012). Pharmacogenomics of tamoxifen: roles of drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Pharmacokinet*, 27(1), 122-131.
- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Sasa, M., Bando, Y., Sumitomo, I., Hosono, N., . . . Zembutsu, H. (2008). Impact of CYP2D6*10 on recurrence-free survival in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen therapy. *Cancer Sci*, 99(5), 995-999. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00780.x
- Kiyotani, K., Mushiroda, T., Zembutsu, H., & Nakamura, Y. (2013). Important and critical scientific aspects in pharmacogenomics analysis: lessons from controversial results of tamoxifen and CYP2D6 studies. *J Hum Genet*, 58(6), 327-333. doi: 10.1038/jhg.2013.39
- Lazarus, P., & Sun, D. (2010). Potential role of UGT pharmacogenetics in cancer treatment and prevention: focus on tamoxifen and aromatase inhibitors. *Drug Metab Rev*, 42(1), 182-194. doi: 10.3109/03602530903208652
- Lim, J. S., Chen, X. A., Singh, O., Yap, Y. S., Ng, R. C., Wong, N. S., . . . Chowbay, B. (2011). Impact of CYP2D6, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tamoxifen pharmacokinetics in Asian breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*, 71(5), 737-750.
- Liu, S., Chia, S. K., Mehl, E., Leung, S., Rajput, A., Cheang, M. C., & Nielsen, T. O. (2010). Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 119(1), 53-61. doi: 10.1007/s10549-009-0318-0
- Madlensky, L., Natarajan, L., Tchu, S., Pu, M., Mortimer, J., Flatt, S. W., . . . Pierce, J. P. (2011). Tamoxifen metabolite concentrations, CYP2D6 genotype, and breast cancer outcomes. *Clin Pharmacol Ther*, 89(5), 718-725. doi: 10.1038/clpt.2011.32
- Markiewicz, A., Welnicka-Jaskiewicz, M., Skokowski, J., Jaskiewicz, J., Szade, J., Jassem, J., & Zaczek, A. J. (2013). Prognostic significance of ESR1 amplification and ESR1 PvuII, CYP2C19*2, UGT2B15*2 polymorphisms in breast cancer patients. *PLoS One*, 8(8), e72219. doi: 10.1371/journal.pone.0072219
- Maughan, K. L., Lutterbie, M. A., & Ham, P. S. (2010). Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*, 81(11), 1339-1346.

- Mercer, K. E., Apostolov, E. O., da Costa, G. G., Yu, X., Lang, P., Roberts, D. W., . . . Kadlubar, S. A. (2010). Expression of sulfotransferase isoform 1A1 (SULT1A1) in breast cancer cells significantly increases 4-hydroxytamoxifen-induced apoptosis. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 1(2), 92-103.
- Moyer, A. M., Suman, V. J., Weinshilboum, R. M., Avula, R., Black, J. L., Safgren, S. L., . . . Goetz, M. P. (2011). SULT1A1, CYP2C19 and disease-free survival in early breast cancer patients receiving tamoxifen. *Pharmacogenomics*, 12(11), 1535-1543. doi: 10.2217/pgs.11.97
- Mugundu, G. M., Sallans, L., Guo, Y., Shaughnessy, E. A., & Desai, P. B. (2012). Assessment of the impact of CYP3A polymorphisms on the formation of α -hydroxytamoxifen and N-desmethyltamoxifen in human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(2), 389-396.
- Munshi, A., & Singh, P. (2008). Tamoxifen in breast cancer: not so easy to write off. *Breast*, 17(2), 121-124. doi: 10.1016/j.breast.2007.08.010
- Murdter, T. E., Schroth, W., Bacchus-Gerybadze, L., Winter, S., Heinkele, G., Simon, W., . . . Brauch, H. (2011). Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I and II enzymes on their concentration levels in plasma. *Clin Pharmacol Ther*, 89(5), 708-717. doi: 10.1038/clpt.2011.27
- Newman, W. G., Hadfield, K. D., Latif, A., Roberts, S. A., Shenton, A., McHague, C., . . . Evans, D. G. (2008). Impaired tamoxifen metabolism reduces survival in familial breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 14(18), 5913-5918.
- Nicholson, R. I., & Johnston, S. R. (2005). Endocrine therapy--current benefits and limitations. *Breast Cancer Res Treat*, 93 Suppl 1, S3-10. doi: 10.1007/s10549-005-9036-4
- Nowell, S., Sweeney, C., Winters, M., Stone, A., Lang, N. P., Hutchins, L. F., . . . Ambrosone, C. B. (2002). Association between sulfotransferase 1A1 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen therapy. *J Natl Cancer Inst*, 94(21), 1635-1640.
- Nowell, S. A., Ahn, J., Rae, J. M., Scheys, J. O., Trovato, A., Sweeney, C., . . . Ambrosone, C. B. (2005). Association of genetic variation in tamoxifen-metabolizing enzymes with overall survival and recurrence of disease in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 91(3), 249-258. doi: 10.1007/s10549-004-7751-x

- Ntukidem, N. I., Nguyen, A. T., Stearns, V., Rehman, M., Schott, A., Skaar, T., . . . Hayes, D. F. (2008). Estrogen receptor genotypes, menopausal status, and the lipid effects of tamoxifen. *Clin Pharmacol Ther*, 83(5), 702-710. doi: 10.1038/sj.clpt.6100343
- Okishiro, M., Taguchi, T., Jin Kim, S., Shimazu, K., Tamaki, Y., & Noguchi, S. (2009). Genetic polymorphisms of CYP2D6 10 and CYP2C19 2, 3 are not associated with prognosis, endometrial thickness, or bone mineral density in Japanese breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen. *Cancer*, 115(5), 952-961. doi: 10.1002/cncr.24111
- Onitilo, A. A., McCarty, C. A., Wilke, R. A., Glurich, I., Engel, J. M., Flockhart, D. A., . . . Skaar, T. C. (2009). Estrogen receptor genotype is associated with risk of venous thromboembolism during tamoxifen therapy. *Breast cancer research and treatment*, 115(3), 643-650.
- Palmieri, C., Patten, D. K., Januszewski, A., Zucchini, G., & Howell, S. J. (2013). Breast cancer: Current and future endocrine therapies. *Mol Cell Endocrinol*. doi: 10.1016/j.mce.2013.08.001
- Rae, J. M., Drury, S., Hayes, D. F., Stearns, V., Thibert, J. N., Haynes, B. P., . . . Dowsett, M. (2012). CYP2D6 and UGT2B7 genotype and risk of recurrence in tamoxifen-treated breast cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, 104(6), 452-460.
- Regan, M. M., Leyland-Jones, B., Bouzyk, M., Pagani, O., Tang, W., Kammler, R., . . . Viale, G. (2012). CYP2D6 genotype and tamoxifen response in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: the breast international group 1-98 trial. *J Natl Cancer Inst*, 104(6), 441-451. doi: 10.1093/jnci/djs125
- Rofaiel, S., Muo, E. N., & Mousa, S. A. (2010). Pharmacogenetics in breast cancer: steps toward personalized medicine in breast cancer management. *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 3, 129.
- Ruiter, R., Bijl, M. J., van Schaik, R. H., Berns, E. M., Hofman, A., Coebergh, J. W., . . . Stricker, B. H. (2010). CYP2C19*2 polymorphism is associated with increased survival in breast cancer patients using tamoxifen. *Pharmacogenomics*, 11(10), 1367-1375. doi: 10.2217/pgs.10.112
- Sainsbury, R. (2013). The development of endocrine therapy for women with breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 39(5), 507-517. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.07.006

- Saladores, P. H., Precht, J. C., Schroth, W., Brauch, H., & Schwab, M. (2013). Impact of metabolizing enzymes on drug response of endocrine therapy in breast cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 13(4), 349-365. doi: 10.1586/erm.13.26
- Schiavon, G., & Smith, I. E. (2013). Endocrine therapy for advanced/metastatic breast cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 27(4), 715-736, viii. doi: 10.1016/j.hoc.2013.05.004
- Schroth, W., Antoniadou, L., Fritz, P., Schwab, M., Muerdter, T., Zanger, U. M., . . . Brauch, H. (2007). Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol*, 25(33), 5187-5193. doi: 10.1200/jco.2007.12.2705
- Schroth, W., Goetz, M. P., Hamann, U., Fasching, P. A., Schmidt, M., Winter, S., . . . Brauch, H. (2009). Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *JAMA*, 302(13), 1429-1436. doi: 10.1001/jama.2009.1420
- Sensorn, I., Sirachainan, E., Chamnanphon, M., Pasomsub, E., Trachu, N., Supavilai, P., . . . Pinthong, D. (2013). Association of CYP3A4/5, ABCB1 and ABCC2 polymorphisms and clinical outcomes of Thai breast cancer patients treated with tamoxifen. *Pharmgenomics Pers Med*, 6, 93-98. doi: 10.2147/pgpm.s44006
- Serrano, D., Lazzeroni, M., Zambon, C. F., Macis, D., Maisonneuve, P., Johansson, H., . . . Bonanni, B. (2011). Efficacy of tamoxifen based on cytochrome P450 2D6, CYP2C19 and SULT1A1 genotype in the Italian Tamoxifen Prevention Trial. *Pharmacogenomics J*, 11(2), 100-107. doi: 10.1038/tpj.2010.17
- Singh, M. S., Francis, P. A., & Michael, M. (2011). Tamoxifen, cytochrome P450 genes and breast cancer clinical outcomes. *The Breast*, 20(2), 111-118.
- Sirachainan, E., Jaruhathai, S., Trachu, N., Panvichian, R., Sirisinha, T., Ativitavas, T., . . . Sukasem, C. (2012). CYP2D6 polymorphisms influence the efficacy of adjuvant tamoxifen in Thai breast cancer patients. *Pharmgenomics Pers Med*, 5, 149-153. doi: 10.2147/pgpm.s32160
- Song, M., Lee, K. M., & Kang, D. (2011). Breast cancer prevention based on gene–environment interaction. *Molecular carcinogenesis*, 50(4), 280-290.
- Sun, D., Sharma, A. K., Dellinger, R. W., Blevins-Primeau, A. S., Balliet, R. M., Chen, G., . . . Lazarus, P. (2007). Glucuronidation of active tamoxifen metabolites by the human UDP glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos*, 35(11), 2006-2014. doi: 10.1124/dmd.107.017145

- Teft, W. A., Gong, I. Y., Dingle, B., Potvin, K., Younus, J., Vandenberg, T. A., . . . Kim, R. B. (2013). CYP3A4 and seasonal variation in vitamin D status in addition to CYP2D6 contribute to therapeutic endoxifen level during tamoxifen therapy. *Breast Cancer Res Treat*, 139(1), 95-105. doi: 10.1007/s10549-013-2511-4
- Teh, L., Mohamed, N., Salleh, M., Rohaizak, M., Shahrin, N., Saladina, J., . . . Rajoo, T. (2012). The risk of recurrence in breast cancer patients treated with tamoxifen: polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *The AAPS journal*, 14(1), 52-59.
- Toyama, T., Yamashita, H., Sugiura, H., Kondo, N., Iwase, H., & Fujii, Y. (2009). No association between CYP2D6* 10 genotype and survival of node-negative Japanese breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen treatment. *Japanese journal of clinical oncology*, 39(10), 651-656.
- Tucker, A. N., Tkaczuk, K. A., Lewis, L. M., Tomic, D., Lim, C. K., & Flaws, J. A. (2005). Polymorphisms in cytochrome P4503A5 (CYP3A5) may be associated with race and tumor characteristics, but not metabolism and side effects of tamoxifen in breast cancer patients. *Cancer Lett*, 217(1), 61-72. doi: 10.1016/j.canlet.2004.08.027
- van Schaik, R. H., Kok, M., Sweep, F. C., van Vliet, M., van Fessem, M., Meijer-van Gelder, M. E., . . . Berns, E. M. (2011). The CYP2C19*2 genotype predicts tamoxifen treatment outcome in advanced breast cancer patients. *Pharmacogenomics*, 12(8), 1137-1146. doi: 10.2217/pgs.11.54
- Webb, P., Nguyen, P., Valentine, C., Weatherman, R. V., Scanlan, T. S., & Kushner, P. J. (2000). An antiestrogen-responsive estrogen receptor-alpha mutant (D351Y) shows weak AF-2 activity in the presence of tamoxifen. *J Biol Chem*, 275(48), 37552-37558. doi: 10.1074/jbc.M007435200
- Wegman, P., Elingarami, S., Carstensen, J., Stal, O., Nordenskjold, B., & Wingren, S. (2007). Genetic variants of CYP3A5, CYP2D6, SULT1A1, UGT2B15 and tamoxifen response in postmenopausal patients with breast cancer. *Breast Cancer Res*, 9(1), R7. doi: 10.1186/bcr1640
- Wegman, P., Vainikka, L., Stal, O., Nordenskjold, B., Skoog, L., Rutqvist, L.-E., & Wingren, S. (2005). Genotype of metabolic enzymes and the benefit of tamoxifen in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 7(3), R284-R290.

- Westbrook, K., & Stearns, V. (2013). Pharmacogenomics of Breast Cancer Therapy: An Update. *Pharmacology & therapeutics*.
- Wood, A. J., & Osborne, C. K. (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 339(22), 1609-1618.
- Wu, X., Hawse, J. R., Subramaniam, M., Goetz, M. P., Ingle, J. N., & Spelsberg, T. C. (2009). The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor alpha for degradation in breast cancer cells. *Cancer Res*, 69(5), 1722-1727. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-3933
- Xu, Y., Sun, Y., Yao, L., Shi, L., Wu, Y., Ouyang, T., . . . Xie, Y. (2008). Association between CYP2D6 *10 genotype and survival of breast cancer patients receiving tamoxifen treatment. *Ann Oncol*, 19(8), 1423-1429. doi: 10.1093/annonc/mdn155
- Yang, G., Nowsheen, S., Aziz, K., & Georgakilas, A. G. (2013). Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacol Ther*, 139(3), 392-404. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.05.005
- Yip, C. H., Smith, R. A., Anderson, B. O., Miller, A. B., Thomas, D. B., Ang, E. S., . . . McTiernan, A. (2008). Guideline implementation for breast healthcare in low- and middle-income countries. *Cancer*, 113(S8), 2244-2256.
- Yoneda, K., Tanji, Y., Ikeda, N., Miyoshi, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., & Noguchi, S. (2002). Influence of adjuvant tamoxifen treatment on bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal breast cancer patients in Japan. *Cancer Lett*, 186(2), 223-230.
- Zafra-Ceres, M., de Haro, T., Farez-Vidal, E., Blancas, I., Bandres, F., de Dueñas, E. M., . . . Gomez-Llorente, C. (2013). Influence of CYP2D6 Polymorphisms on Serum Levels of Tamoxifen Metabolites in Spanish Women with Breast Cancer. *International journal of medical sciences*, 10(7), 932.

Webpages

<http://www.ligacontracancro.pt/gca/?id=42#>, consultado em 06/02/2014.

<http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index3.html>, consultado em 04/02/2014.

<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-cancer>, consultado em 06/02/2014.

<http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/o-cancro-da-mama.html>, consultado em 05/11/2013.

<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-detection>, consultado em 20/01/2014.

http://www.who.int/diagnostic_imaging/imaging_modalities/dim_mammography/en/ consultado em 27/01/2014.

<http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-mama/diagnostico-mama.html>, consultado em 20/10/2013.